

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Producción Animal I



TESIS DOCTORAL

**Adaptación de microalgas a contaminantes
antropogénicos emergentes: aplicaciones**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Julia Romero López

Directores
Victoria López Rodas
Eduardo Costas Costas

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Producción Animal

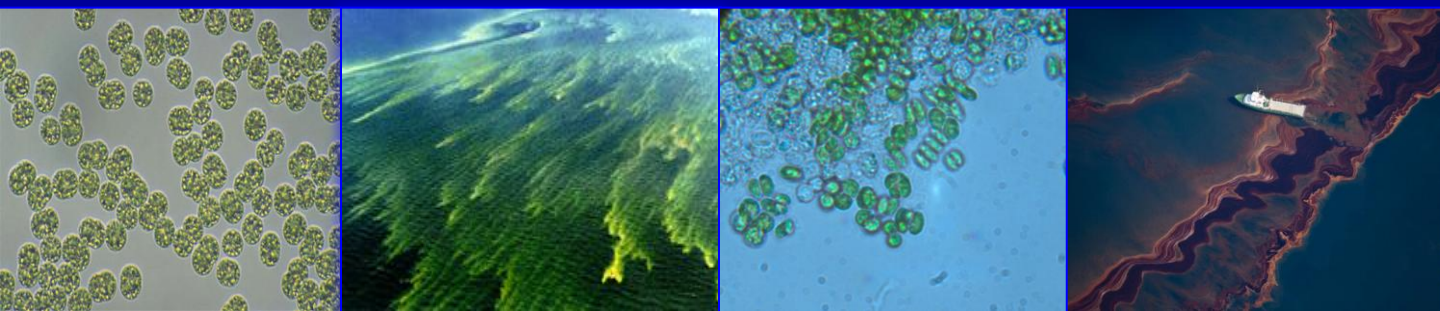


**ADAPTACIÓN DE MICROALGAS A
CONTAMINANTES ANTROPOGÉNICOS
EMERGENTES: APLICACIONES**

TESIS DOCTORAL

Julia Romero López

2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Producción Animal



**ADAPTACIÓN DE MICROALGAS A CONTAMINANTES
ANTROPOGÉNICOS EMERGENTES: APLICACIONES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Julia Romero López

Bajo la dirección de los doctores

Victoria López Rodas y Eduardo Costas Costas

Trabajo Financiado en parte por Iberdrola. Ingeniería y
Construcción.SAU

Madrid, Mayo 2014



El Dr. Eduardo Costas Costas, Catedrático de Genética del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y la Dra. Victoria López Rodas, Catedrática de Genética del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

INFORMAN:

Que el trabajo de Tesis titulado: “Adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos emergentes: Aplicaciones”, ha sido realizado en el Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo nuestra Dirección.

Y para que así conste lo firmamos en Madrid a cinco de mayo de dos mil catorce.

Dr. Eduardo Costas Costas
Catedrático de Genética.
Dpto. de Producción Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid

Dra. Victoria López Rodas
Catedrático de Genética.
Dpto. de Producción Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid

A mis padres

Como tantos otros químicos:

“... Pertenezco a esa extraña clase de mortales movidos a buscar su placer entre el humo y sus vapores, el hollín y la llama, los venenos y la pobreza. Y sin embargo, me parece vivir así tan dulcemente, que moriría antes de cambiarme por el rey de Persia...”

J.J. Becher

1.	RESUMEN.....	13
2.	SUMMARY	17
3.	INTRODUCCIÓN.....	21
	Mecanismos de adaptación de microorganismos a contaminantes antropogénicos específicos: petróleo y diesel	28
	Factores que influyen en la evolución y la adaptación de microorganismos: La genética poblacional y cuantitativa de los organismos haploides con reproducción asexual	32
	Aplicaciones de la adaptación de microorganismos a contaminantes antropogénicos específicos: Degradación de petróleo y derivados	34
4.	OBJETIVOS	37
5.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
5.1.	Mecanismos de adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos.....	43
	Medida de la máxima respuesta a la selección tras el experimento de Ratchet.	46
	Test de toxicidad inicial:	48
	Análisis de Fluctuación:.....	49
	Mejora y selección de organismos resistentes mediante el sistema de ratchet:	53
	Test de toxicidad final:	56
5.2.	Medida de la máxima respuesta a la selección tras el experimento de Ratchet.	57
5.3.	Aplicaciones de los microorganismos obtenidos por selección artificial a distintos problemas de biorremediación de contaminantes antropogénicos.....	60

Análisis de biodegradación y/o bioacumulación de petróleo y derivados	63
Diseño estadístico:	65
6. RESULTADOS	67
6.1. Mecanismos de adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos: petróleo y diesel.....	69
Resultados del Test de toxicidad inicial.....	69
Resultados del análisis de fluctuación:	71
Resultados de la selección y mejora de resistentes mediante ratchet:	76
Resultados del Test de toxicidad final:	79
6.2. Resultados de la respuesta de la eficacia biológica (fitness malthusiano) a la selección durante el experimento de Ratchet.	83
6.3. Aplicaciones de la adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos: biorremediación de petróleo en ecosistemas acuáticos.	88
Resultados del Análisis estadístico: Comprobación de la existencia de biodegradación	89
Cálculo de las tasas de biodegradación de Hidrocarburos	90
Cálculo de las diferencias entre las tasas de biodegradación de Hidrocarburos	91
7. DISCUSIÓN	93
7.1. Mecanismos de adaptación y mejora de microalgas a contaminantes antropogénicos.....	95
7.2. Respuesta de la eficacia biológica (fitness malthusiano) a la selección durante el experimento de Ratchet.....	100
7.3. La adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos específicos: petróleo	103

INDICE

Comparación de Métodos físicos y químicos vs Métodos biológicos	104
Comparación entre los distintos microorganismos de Biorremediación	106
8. CONCLUSIONES	109
9. BIBLIOGRAFÍA	113
10. ANEXO	127
11. AGRADECIMIENTOS	149

1. RESUMEN

El cambio global antropogénico, con sus consecuencias en contaminación y calentamiento global, está causando una extraordinaria pérdida de biodiversidad, conocida como la sexta gran extinción. Se sabe muy poco sobre los efectos de este cambio global en organismos tan importantes como el fitoplancton, pese a que son los responsables de la mitad de la producción primaria del planeta y controlan los ciclos biogeoquímicos del carbono, fósforo y nitrógeno. Entre los mayores contaminantes antropogénicos actuales se encuentran el petróleo y sus derivados, que tienen un gran efecto sobre los organismos fitoplanctónicos. El presente trabajo estudia la adaptación de los organismos fitoplanctónicos al petróleo y al diesel. Dada la diversidad del fitoplancton, trabajamos con diferentes especies que representan a distintos grupos funcionales-taxonómicos.

En su primera parte, nuestro trabajo demuestra (mediante análisis de fluctuación) que el fitoplancton es capaz de adaptarse a bajas dosis de petróleo o diesel exclusivamente mediante mecanismos de aclimatación fisiológica. Sin embargo, a medida que las dosis de contaminante se incrementan, solo la aparición de nuevos mutantes que confieren resistencia, asegura la adaptación. Estos mutantes aparecen aleatoriamente antes de la exposición a los hidrocarburos. En ningún caso, ni el petróleo ni el gasoil, favorecen la aparición de resistentes.

Además realizamos un estudio de la máxima capacidad de adaptación de estos organismos al petróleo y al diesel (mediante un procedimiento de Ratchet). Existen enormes diferencias en la capacidad de adaptación de las distintas especies, pero algunas de ellas logran adaptarse y proliferar en presencia de grandes dosis de contaminantes. En este apartado realizamos una contribución conceptual novedosa, determinando la respuesta a la selección y la heredabilidad (entendida como capacidad para responder a la selección).

Finalmente, estudiamos la posibilidad de aprovechar en la práctica esta capacidad de adaptación. Los resultados analíticos demuestran que los organismos seleccionados, que presentan la máxima resistencia a los hidrocarburos, son capaces de degradar eficazmente estos compuestos, en un corto período de tiempo. Este hecho conlleva interesantes posibilidades aplicadas.

2. SUMMARY

Anthropogenic global change with its impact on global warming and pollution is causing an extraordinary loss of biodiversity (called The Sixth Great Extinction). Very little is known about the effects of global change on important organisms such as phytoplankton, although they are responsible for half of the primary production of the Earth, controlling the biogeochemical cycles of C, P and N. Among the biggest anthropogenic pollutants are the crude oil and its derivatives, which have a great effect on phytoplankton organisms. This paper studies the adaptation of phytoplankton species to crude oil and diesel. Due to the diversity of phytoplanktonic species we work with diverse species representing different functional - taxonomic groups.

The first part of our work demonstrates (through fluctuation analysis) that phytoplankton can adapt to low doses of oil or diesel only by means of physiological acclimation mechanisms. However as contaminant doses are increased, only the appearance of new mutants conferring resistance ensures adaptation. These mutants appear randomly before the exposure to hydrocarbons. In any case, neither oil nor diesel favor the emergence of resistant .

We also perform a study to determine the maximum capability of these organisms to adapt to crude oil and diesel (by a process of Ratchet). There are huge differences in the adaptability of different species, but some of them were able to adapt and grow under large doses of pollutants. In this section we make a conceptual contribution by determining the response to selection and the heritability (defined as the ability to respond to selection).

Finally we study the possibility of using this adaptability in the practice. Analytical results demonstrate that the selected organisms with high oil resistance are able to effectively degrade these hydrocarbons in a quick time. This fact opens interesting possibilities for practical applications.

3. INTRODUCCIÓN

"Es más lo que ignoramos que lo que conocemos y la mayoría de las buenas preguntas no han sido aún formuladas"

Helen Curtis

La especie humana es una especie con mucho éxito evolutivo. Somos muchos y crecemos exponencialmente. Pero nuestra acción sobre el planeta está provocando enormes cambios en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas.

Nuestra presencia en la Tierra deja una huella ecológica que lleva consigo la modificación de los ciclos biogeoquímicos y el clima. Está disminuyendo la diversidad de organismos que se homogeneizan, haciendo proliferar especies oportunistas e invasoras y originando nuevos problemas ambientales emergentes (Myers & Knoll 2001). Esta modificación del entorno, de manera directa o indirecta, produce presiones ambientales tan fuertes que, aproximadamente entre 3.000 y 30.000 especies se extinguen anualmente (Hughes, 2000).

Estamos inmersos en la sexta gran extinción y somos la causa principal de todos los cambios que está sufriendo el planeta, pero probablemente también somos las víctimas.

Cualquier extinción masiva se caracteriza porque tiene lugar en períodos cortos de tiempo donde se eliminan simultáneamente gran número de organismos y de especies. Durante estos procesos catastróficos desaparecen en los ecosistemas, muchos grupos taxonómicos. Estas variaciones en la composición de los ecosistemas después de los eventos de extinción, pueden diferir notablemente respecto a las fases evolutivas anteriores, independientemente del éxito alcanzado en ellas.

Las causas de las extinciones masivas siguen siendo un problema complejo y muy discutido, aunque generalmente se diferencian dos grupos de causas: cósmicas o extraterrestres y terrestres.

Entre las causas cósmicas, la más conocida es la teoría del impacto (Alvarez et al. 1980), donde se considera que la extinción del final del Cretácico, fue originada por el impacto de un gran meteorito.

En un gran número de lugares más o menos distantes, los sedimentos que se depositaron durante esta extinción, incluso en el plancton marino, están muy enriquecidos en iridio y otros elementos, que probablemente proceden de una fuente extraterrestre (Smit & Kate 1982).

Mientras que la única evidencia a favor de una causa extraterrestre de extinción masiva, es una anomalía del iridio en el cretácico, existen numerosas pruebas que relacionan las extinciones masivas con eventos terrestres. Estos eventos se refieren a cambios en el nivel del mar, cambios climáticos, el volcanismo, etc. Las oscilaciones en el nivel del mar causadas por los fenómenos de glaciación y deshielo, pudieron ser una de las causas que produjeron episodios de extinción y especiación.

La diversificación explosiva de grupos fitoplanctónicos como cocolitoforidos, dinoflagelados o diatomeas tuvo lugar coincidiendo con una de las mayores subidas del nivel del mar que se conocen (Hallam 1986).

Otra hipótesis bastante utilizada para explicar extinciones masivas, es la que propugna cambios climáticos, los cuales son inseparables de los cambios del nivel del mar. Se han descrito en numerosas ocasiones, en el pasado geológico, cambios de temperatura a escala global. El registro de la vida muestra que la biosfera, en varias épocas geológicas, fluctuó en relación con la extensión de los mantos de hielo.

Estos acontecimientos han dejado un inconfundible registro, evidenciado en algunas de las extinciones masivas, como es el caso de la gran extinción de la bola de nieve Neoproterozoica, donde el fitoplancton podría haber sobrevivido en refugios como las fuentes termales (Costas et al. 2008) o la gran extinción del Pérmico (Ogden & Sleep 2012). Además las regresiones globales de los mares han podido jugar un doble papel, bien porque hayan producido un cambio en el albedo de la Tierra, o bien porque podrían haber debilitado el efecto invernadero originado por el CO₂ atmosférico (Berner et al. 1983).

Aunque las dos causas de extinción masiva más frecuentes según el registro fósil son el cambio climático y el cambio en el nivel del mar, existen otros fenómenos geológicos a gran escala como las erupciones volcánicas, la actividad tectónica o las plumas de manto, que muestran un comportamiento cíclico y que están relacionadas con extinciones masivas.

Estos fenómenos liberarían grandes cantidades de CO₂, sulfatos y metales pesados que tendrían a su vez efectos sobre el clima y los ecosistemas (Arthur & Garrison 1986).

Numerosos científicos, desde 1970 (Crutzen, 2006), coinciden en llamar a la era actual Antropoceno, en lugar de Holoceno, como se denominaba hasta ahora, debido a la acción que nuestra especie es capaz de ejercer sobre el planeta.

Somos responsables de fenómenos tan importantes como el cambio global, la destrucción de la capa de ozono, la desaparición de especies, la destrucción de hábitats, la acidificación, la eutrofización, o incluso los cambios en la composición de la atmósfera.

El cambio global se produce en parte como consecuencia de la quema de combustibles fósiles que arrojan a la atmósfera unas 450 mil toneladas de CO₂ y es lo que determina el calentamiento global. Sin embargo el cambio global, además del calentamiento, abarca la contaminación, la destrucción de hábitats, la movilidad de las especies y efectos directos sobre los sistemas de obtención de alimentos como son: la pesca, la agricultura y la ganadería. El cambio global y como consecuencia la sexta extinción, es uno de los mayores peligros a los que se ha enfrentado la humanidad.

Estos fenómenos están produciendo una importante reorganización de los grupos de organismos fitoplanctónicos predominantes (adaptación diferencial) (Huertas et al. 2010), lo que puede tener consecuencias inesperadas como ya ha ocurrido antes a lo largo de la historia de la Tierra.

De acuerdo con el Quinto informe de Valoración del Panel internacional de Cambio Climático (IPCC 2013, Working Group I Technical Support Unit), La temperatura media de la superficie de la Tierra ha crecido aproximadamente 1 °C, en el último siglo.

Dado que la emisión de CO₂ a la atmósfera continuará, algunas regiones oceánicas podrían calentarse más rápido que en el último millón de años (Hansen et al. 2000; Belkin 2009). Las predicciones apuntan a que para finales del siglo XXI, la temperatura de la superficie del mar aumente entre 1.18°C (en un escenario de bajas emisiones de CO₂), y 6.48°C (en un escenario de altas emisiones de CO₂) (Meehl et al. 2007).

Los efectos de la crisis ambiental están razonablemente entendidos en algunos organismos como en los vertebrados terrestres, pero se conoce muy poco sobre microorganismos tan importantes como el fitoplancton.

El fitoplancton está constituido por un conjunto polifilético de microorganismos cuya característica común es realizar la fotosíntesis, formando parte de todos los ecosistemas acuáticos del planeta.

Dentro de los ecosistemas acuáticos juegan un papel ecológico esencial, ya que son productores primarios y responsables de aproximadamente la mitad de la producción primaria total del planeta, y por tanto de la mitad del oxígeno atmosférico y de la materia orgánica presente en la Tierra (Falkowski et al. 1998).

El fitoplancton realiza un papel decisivo en los ciclos biogeoquímicos como el del carbono, el nitrógeno y el fósforo. Organismos constituyentes del fitoplancton como las cianobacterias son de los pocos grupos taxonómicos capaces de fijar nitrógeno atmosférico asimilable para el resto de organismos vivos.

Por lo tanto, el fitoplancton es una pieza clave en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos porque son el inicio de la cadena trófica en el agua (Nyholm & Peterson 1997; Western 2001). Debido a su papel fundamental en el funcionamiento de la biosfera cualquier alteración significativa de estos sistemas podría tener consecuencias globales catastróficas.

Hoy en día se considera que los ecosistemas acuáticos se encuentran en una situación de máximo riesgo pues las consecuencias del cambio global llegarán a afectar a todos los componentes de los ecosistemas tanto acuáticos como terrestres (IPCC 2013).

Los contaminantes derivados de la acción del hombre sobre el planeta han modificado el entorno global con un alto coste ecológico (Palumbi 2001). Los elevados niveles de CO₂ y otros gases de efecto invernadero tienen una influencia decisiva sobre los sistemas físicos y biológicos de la Tierra.

Estos elevados niveles son debidos sobre todo a la quema de combustibles fósiles, a los cambios en el uso del suelo y a la deforestación.

Además una de las grandes presiones ambientales que ejerce el hombre son los vertidos masivos de contaminantes procedentes de las ciudades, de la industria o de la actividad agrícola y ganadera, que siempre acaban alcanzando los ecosistemas acuáticos especialmente los costeros y continentales.

La supervivencia de los organismos en contacto con estas sustancias de nueva síntesis suponen un reto al que no se han enfrentado a lo largo de toda su historia evolutiva. Por lo tanto es necesario conocer y comprender como se produce la adaptación de los organismos fotosintéticos del plancton a los contaminantes antropogénicos emergentes, ya que es la única forma de poder realizar predicciones acertadas sobre la evolución de los ecosistemas acuáticos.

Mecanismos de adaptación de microorganismos a contaminantes antropogénicos específicos: petróleo y diesel

En la actualidad, el ritmo de extinción de especies se estima en 500 veces más alto que en el anterior periodo, como consecuencia del cambio global antropogénico (Woodruff, 2001). Poco se sabe acerca de la crisis de la biodiversidad en organismos tan importantes como los microbios. Sin embargo, estudios sobre la adaptación de los microbios al cambio global antropogénico son indispensables, dado que las cadenas tróficas se verán seriamente alteradas, si los microorganismos y el fitoplancton esencial, sucumben a los contaminantes (Woodruff, 2001).

En particular, la tolerancia de microalgas al cambio antropogénico es extremadamente relevante, ya que estos organismos son los productores primarios de los ecosistemas acuáticos (Kirk, 1994; Falkowski & Raven, 1997).

El colapso de especies se puede atribuir principalmente a la incapacidad de los organismos para afrontar drásticos cambios antropogénicos ambientales que ocurren en sus hábitats. La contaminación acuática es una causa importante de este colapso de especies, y los derrames accidentales de crudo de petróleo o productos de derivados del petróleo en los ecosistemas acuáticos, son uno de los problemas ambientales más preocupantes.

El crudo de petróleo es una mezcla de hasta 10.000 tipos diferentes de hidrocarburos altamente tóxicos, que producen grandes daños a los organismos vivos (Dawes, 1998).

En la actualidad, grandes cantidades de crudo de petróleo se extraen, se refinan y se manipulan cada año, y pese a las mejoras en la seguridad, el transporte y la contención, existe la posibilidad de que estas actividades pueden ocasionar vertidos accidentales en los ecosistemas acuáticos. Estas actividades han hecho que el petróleo se convierta en uno de los mayores contaminantes acuáticos de nuestros tiempos (Rahman et al., 2002).

La mayor parte del tiempo este crudo viaja por el agua, e inevitablemente, se producen algunos vertidos desde los propios tanques de los vehículos de transporte o desde los oleoductos.

Además de los vertidos de crudo ocasionales, debido al lavado rutinario de los tanques de almacenamiento, o a pequeños errores en la manipulación, podemos destacar los dos vertidos más importantes de los últimos años.

En primer lugar el vertido del buque Prestige en 2002, que supuso el derrame de más de 50.000 toneladas de crudo sobre las costas gallegas españolas, y cuyos efectos han sido descritos por numerosos autores incluso más de 5 años después del desastre (Carrera-Martinez et al. 2010).

Y en segundo lugar, el vertido procedente de una plataforma petrolífera que se encuentra sobre el mar, en el golfo de Méjico, de la compañía BP.

Los impactos de este último vertido todavía están lejos de conocerse. La fuente del vertido se encuentra por debajo de 1600 metros de agua de mar, los vientos y las corrientes de difusión del crudo hacen que los movimientos de las manchas sean imprevisibles.

Los estudios experimentales sobre el efecto del crudo de petróleo y productos petrolíferos en microalgas han mostrado resultados contradictorios.

El petróleo, generalmente, inhibe la fotosíntesis y el crecimiento de las microalgas (Dahl et al., 1983; Siron et al., 1996; Stepaniyan, 2008; Nayar et al., 2005). El crudo y sus derivados actúan sobre el aparato fotosintético inhibiendo la cadena transportadora de electrones en el fotosistema II (Singh and Gaur, 1988; Aksmann and Tukaj, 2008). Además, altera tanto la integridad como la función de todas las membranas (Wang et al., 2009; Zhang et al., 2005). Las algas expuestas a productos derivados del crudo de petróleo muestran alteraciones en el DNA, RNA y el contenido de proteínas (El Sheekh et al., 2000), y a menudo, reducen la expresión de los genes de pigmentos fotosintéticos, produciendo una desorganización de todas las funciones celulares (Bopp and Lettieri, 2007).

Por otro lado, aunque generalmente los episodios de extinción local de fitoplancton se producen en aguas contaminadas con crudo de petróleo, éste, también puede sobrevivir a los efectos nocivos de los productos petrolíferos mediante algún tipo de adaptación. Varios estudios han puesto de manifiesto el escaso efecto del crudo petróleo, en algunas especies de fitoplancton (Fabregas et al., 1984; Padros et al., 1999).

Un ejemplo fascinante de la adaptación de microalgas a una contaminación extrema de crudo de petróleo ha sido descrito en el río de Arroyo Minero, Argentina (Lopez-Rodas et al., 2009; Carrera-Martinez et al., 2011). Como consecuencia de la prueba de perforación para la explotación del petróleo, una cantidad muy grande de crudo, se lleva filtrando al agua del río constantemente, desde 1915. Sin embargo, cuatro especies de microalgas *Symploca dubia*, *Chlamydomonas dinobryonis*, *Scenedesmus obtusus* and *Scenedesmus sp.* proliferan en contacto con este crudo de petróleo.

El fitoplancton puede adaptarse mediante aclimatación fisiológica (modificaciones en la expresión de los genes) o mediante adaptación genética (nuevas mutaciones que confieren resistencia). Estos mutantes resistentes que aparecen de forma espontánea y se mantienen en las poblaciones mediante equilibrio mutación-selección, tienen una eficiencia fotosintética reducida y una menor tasa de crecimiento, con lo que el cambio global tiende a reducir la eficiencia de la bomba biológica, por lo que la captación de CO₂ podría decrecer.

Pero todavía no se sabe cuál es la capacidad genética de adaptación del fitoplancton al cambio global.

Los organismos fitoplanctónicos son haploides, con reproducción asexual, organizados en conjuntos de clones, con tamaños de poblaciones ingentes y tiempos de generación cortos. Por lo tanto, son un buen modelo para ver la evolución en acción.

Un intento para dilucidar los mecanismos implicados en la adaptación de las microalgas a la contaminación por crudo de petróleo y derivados, muestra que *Scenedesmus sp* puede adaptarse a bajas concentraciones de petróleo por medio de aclimatación fisiológica (Lopez-Rodas et al., 2009; Carrera-Martinez et al., 2011). Sin embargo, algunas raras

variantes de esta especie, son capaces de crecer bajo altos niveles de crudo.

Después de realizar algunos experimentos, se sabe que estos mutantes resistentes al crudo de petróleo, han surgido a través de una rara mutación espontánea que ocurrió antes de la exposición de estas especies al agente selectivo. (Carrera-Martinez et al., 2011).

Un resultado similar fue observado previamente en *Dunaliella tertiolecta* en el accidente del petrolero Prestige que tuvo lugar en las costas españolas en el año 2002 (Carrera-Martinez et al., 2010).

A pesar de esto, la adaptación de fitoplancton a la exposición de crudo de petróleo todavía ha sido poco estudiada y documentada. Una sola mutación resistente es suficiente para asegurar la supervivencia de algunas variantes de microalgas bajo contaminación de crudo de petróleo (Carrera-Martinez et al., 2010, 2011).

La teoría evolucionista, sin embargo, asume que la adaptación a condiciones extremas, depende de la ocurrencia de varias mutaciones que confieren resistencia y su posterior supervivencia motivada por la selección natural de tales mutaciones. Después de la aparición de la primera mutación que confiere resistencia al contaminante en cuestión, la selección de nuevas mutaciones debe desempeñar un papel importante en el proceso de adaptación.

Factores que influyen en la evolución y la adaptación de microorganismos: La genética poblacional y cuantitativa de los organismos haploides con reproducción asexual

Existen numerosos estudios que demuestran la idea original de Darwin sobre la evolución basada en la selección natural de los organismos mejor adaptados en las poblaciones (Gould 2002). La adaptación genética, como consecuencia de la selección natural, es considerada actualmente la mayor fuerza evolutiva. Sin embargo existen otros dos factores que también contribuyen de una manera importante al cambio evolutivo: la contingencia histórica y el azar (Flores et al, 2008).

La contingencia histórica puede llegar a ser importante si ciertos cambios genéticos con valor adaptativo en el pasado, contienen o promueven resultados evolutivos (Gould & Lewontin 1979; Blount et al. 2008). Por otro lado, los efectos del azar normalmente son debidos a la deriva genética y a mutaciones que se producen aleatoriamente, sin ningún valor para los organismos. (Crow & Kimura 1970; Kimura 1983; Spiess 1989).

La consecuencia final es que algunas características que no mejoran ni disminuyen la adaptación se mantienen en las poblaciones.

La genética de poblaciones se considera la principal base conceptual de la evolución, (Gould, 2002). Mayoritariamente la genética de poblaciones trata sobre organismos diploides que se reproducen sexualmente en las denominadas poblaciones mendelianas (Crow & Kimura, 1976). Estos conjuntos de organismos que intercambian un pool génico son muy diferentes a las poblaciones microbianas, por lo general haploides, con claro predominio de reproducción asexual. No olvidemos que la reproducción sexual y la diploidía son "inventos" evolutivos relativamente recientes, mientras que la mayor parte de la historia de la vida sobre la Tierra, fue escrita por microorganismos haploides asexuales.

Aún hoy en día estos microorganismos, son los que controlan la mayor parte de los ciclos biogeoquímicos vitales del planeta.

Sin embargo la genética evolutiva de estos microorganismos se encuentra actualmente en sus comienzos. Einstein decía que una manera interesante de avanzar en ciencia era hacer experimentos con modelos extremos. Según esto, el caso más extremo, sería estudiar la evolución de una población de organismos haploides que se reproduzcan asexualmente empezando desde un único individuo. Con el tiempo tendríamos un conjunto de individuos genéticamente idénticos. Después aparecerían mutaciones, primero una, y después otras, generándose finalmente una población, constituida por un conjunto de clones que se reproducen asexualmente, es decir, no mendeliana. En estos momentos las distintas fuerzas evolutivas selección y deriva genética entrarían en acción.

Hasta el momento este es un problema que no ha sido tratado en profundidad en la genética de poblaciones.

En este trabajo de investigación proponemos realizar una aproximación totalmente diferente al abordaje clásico, para profundizar en los mecanismos evolutivos de poblaciones no mendelianas.

La genética cuantitativa clásica mide la heredabilidad, calculando la intensidad de selección y estima la máxima respuesta a la selección. Nosotros procederemos al contrario. Podemos realizar experimentos evolutivos en el laboratorio implicando centenares de generaciones, estimando en primer lugar la máxima respuesta a la selección y su intensidad, para posteriormente calcular la heredabilidad.

La máxima respuesta a la selección, va a ser un parámetro medible experimentalmente. A partir de él, estimaremos el resto de parámetros mencionados.

Aunque partimos de una población inicial sin ninguna variabilidad genética, llegaremos a una población final con mucha variabilidad, como resultado de la acción de las fuerzas evolutivas que han actuado a lo largo del desarrollo de los experimentos (mutación, selección y deriva).

Se trata de un objetivo sin duda muy ambicioso, que hasta el momento no ha sido abordado.

Aplicaciones de la adaptación de microorganismos a contaminantes antropogénicos específicos: Degradación de petróleo y derivados

La vida marina en la ruta del crudo se extiende sobre cientos de kilómetros cuadrados, desde el fondo del mar a la superficie. La pesca comercial siempre está afectada, y las frágiles marismas costeras están en riesgo. El seguimiento de todos estos ecosistemas es el primer reto; medir el número de especies afectadas y emitir las consecuencias será un paso posterior.

Los hidrocarburos presentes en el medio marino pueden provenir de las filtraciones naturales de petróleo o de las actividades humanas, incluyendo la extracción, transporte, refinado, almacenamiento y utilización de los derivados del petróleo (Trolie et al. 1999; Venosa 2003).

Muchos hidrocarburos, contenidos en el crudo, tienen efectos muy tóxicos sobre los ecosistemas acuáticos.

Las consecuencias de los vertidos de crudo de petróleo en el agua suelen ser catastróficas. En los ecosistemas acuáticos, sus principales componentes, los hidrocarburos, pueden permanecer durante más de 5 años ejerciendo su acción tóxica recalcitrante, después de los primeros vertidos (Lindstrom & Braddock 2002; Kobayashi et al. 2009; Pelletier et al. 2004).

La magnitud de las catástrofes dependerá del alcance del crudo, de la cantidad de petróleo vertida, de cómo se transforma química y físicamente, y de cuáles son las condiciones de su desplazamiento, debido a las corrientes y mareas.

En la actualidad, podemos encontrar numerosos intentos por reducir los impactos producidos por los vertidos. Estos procesos podemos dividirlos en tres grandes grupos:

Métodos Físicos: hasta ahora los primeros en utilizarse en todas las catástrofes ocurridas, consistentes en la eliminación del crudo mediante su recogida mecánica con grúas, con redes o incluso manualmente.

Métodos Químicos: consistentes en la acción de un agente químico que degrade los componentes del crudo de petróleo en otro tipo de componentes fácilmente eliminables, menos tóxicos, o que permitan eliminar los desechos del vertido mediante métodos físicos.

Métodos Biológicos de degradación (biorremediación): procesos de degradación de compuestos químicos mediante organismos vivos, especialmente microorganismos, para obtener energía, metabolitos celulares y productos de desecho biológico (Rahman et al. 2002).

Estos microorganismos pueden ser desde organismos de una única especie, consorcios de varias especies que optimizan el rendimiento de degradación, hasta organismos modificados genéticamente para obtener un mayor rendimiento en la degradación.

La mayoría de los organismos empleados en la biorremediación de vertidos de crudo de petróleo han sido bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (Obayori 2009; Medina, et al 2005), *Rhodococcus opacus* (Wnkelmann et al. 2009), consorcios de bacterias (Komukai-Nakamura et al. 1996; Rahman, et al. 2002;) o incluso los últimos avances de la ingeniería genética han proporcionado bacterias modificadas genéticamente que han resultado más eficientes que sus correspondientes salvajes.

Hasta ahora, la mayoría de los intentos de eliminación del crudo, suponían generar residuos peligrosos (Incardona et al. 2009; Wang et al. 2009) o incluso poblaciones bacterianas, que desplazarían los ciclos de vida existentes en las zonas afectadas.

Pero, ¿qué pasaría si pudiéramos encontrar un organismo que fuera capaz de degradar el petróleo y además contribuir a la formación de una nueva cadena trófica constituyendo una población de productores primarios?

4. OBJETIVOS

"Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión,
de dudar de cualquier afirmación y de corregir errores."

Julius Robert

Para poder comprender en profundidad los mecanismos de adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos emergentes, debemos, en primer lugar, describir los factores que condicionan el proceso evolutivo de estos microorganismos.

Una vez comprendidos estos factores, y el peso de cada uno de ellos en la evolución de las distintas especies, podremos saber sobre cuáles de ellos podemos influir.

Planteando experimentos de laboratorio que controlen los distintos factores que influyen en el proceso evolutivo, y sometiendo a distintas especies a distintos contaminantes antropogénicos, podemos discernir cuáles son los mecanismos más probables de la adaptación de las microalgas a esos contaminantes antropogénicos.

Comprendidos estos mecanismos, podremos aplicar técnicas de selección artificial para separar mutantes resistentes a los contaminantes mencionados.

Si realizamos experimentos de adaptación con dosis controladas crecientes, podremos seleccionar mutantes mejorados, que resistirán dosis más altas que los iniciales obtenidos por selección artificial inducida.

Con los resultados de estos experimentos intentaremos desvelar los procesos poblacionales calculando las heredabilidades (que toman valores distintos de cero cuando la mutación hace aparecer nueva variabilidad genética), o la intensidad de selección que realizan estos contaminantes antropogénicos.

Mediante un diseño experimental relativamente sencillo, podremos explicar en qué se basa la resistencia de estos mutantes a los contaminantes antropogénicos ensayados, lo que nos permitirá elegir las aplicaciones más útiles en las que podrían ser empleados.

Numerosas serían las aplicaciones para las que podrían usarse estos mutantes mejorados, pero en este caso, estudiaremos sólo algunas de ellas, como pueden ser la biorremediación de estos contaminantes en ecosistemas acuáticos contaminados o la detección de contaminantes en pequeñas dosis.

OBJETIVOS

- Conocer las fuerzas evolutivas que intervienen en la adaptación de microalgas a distintos contaminantes procedentes de la acción antropogénica.
- Determinar los mecanismos de adaptación del fitoplancton a crudos de petróleo y combustibles de base petrolífera: obtención de organismos resistentes.
- Estudiar la respuesta a la selección de los mutantes resistentes.
- Desarrollar un programa de mejora genética por selección artificial para organismos haploides frente a los contaminantes estudiados.
- Estimar los principales parámetros de la genética cuantitativa de estas peculiares poblaciones de organismos haploides con reproducción asexual.
- Analizar la capacidad de biodegradación/bioeliminación y biorremediación de los organismos seleccionados.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

"... sin un gran entusiasmo, sin la decisión de dirigir la mirada hacia abajo, sin la sed de conocer, sin la disposición a despojarse de toda presunción para ser alumno modesto, será imposible realizar ninguna investigación o hacerla bien".

Mao Tse-Tung

Describiremos el material y métodos en orden a las preguntas y experimentos planteados.

5.1. Mecanismos de adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos

Conociendo los factores que influyen en el proceso evolutivo uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar los efectos tóxicos a corto y a largo plazo del crudo de petróleo y del petróleo, así como del combustible diesel, elegidos como un ejemplo representativo de la contaminación antropogénica en los ecosistemas acuáticos. Los estudios se realizaron tanto en el fitoplancton marino, como en el continental, con el fin de evaluar su potencial de adaptación.

Este estudio podría proporcionar evidencias de la respuesta a la contaminación, que permiten evaluar cómo el fitoplancton podría responder a la contaminación con productos del petróleo en un futuro cercano. Aunque estos experimentos podrían ser considerados una simplificación de la realidad, el enfoque evolutivo-ecológico seguido aquí constituye una forma de explorar, a través de un modelo experimental riguroso, la capacidad de las microalgas para adaptarse al petróleo y sus derivados.

Organismos experimentales y condiciones de cultivo:

Como organismos experimentales para realizar un estudio de los mecanismos de adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos se utilizaron los siguientes:

- una cepa de *Scenedesmus intermedius* Chodat (SiD1).

Especie generalmente dispuesta en cenobios de 4 a 8 células, alargadas, fusiformes, ligeramente curvada -alcanzando la máxima curvatura las células situadas al exterior-. Alcanzan una longitud de 25-30 μm y un diámetro de 3-6 μm . Destaca una pared celular de hemicelulosa lisa pero bien visible. Células uninucleadas, generalmente con un cloroplasto único, conteniendo un simple pirenoide. Sin embargo se trata de una especie muy polimórfica. Es una especie planktónica de agua dulce, prefiriendo ambientes eutróficos.



Figura 1: *Scenedesmus intermedius* Chodat (Protist Information Server)

- una cepa de *Microcystis aeruginosa* (Kützinger).

Células esféricas, pequeñas (2-5 μm de diámetro), generalmente agrupadas por mucílago formando colonias en las que las células aparecen agrupadas muy densamente; estas colonias que llegan a ser lo suficientemente grandes como para poder detectarse a simple vista con su característico color verde-azulado. Cerca de la superficie celular se distingue un patrón reticulado. La división celular ocurre en 3 planos, perpendiculares uno a otro en las sucesivas generaciones. Se trata de una cianobacteria ubicua que prefiere los ambientes eutróficos.

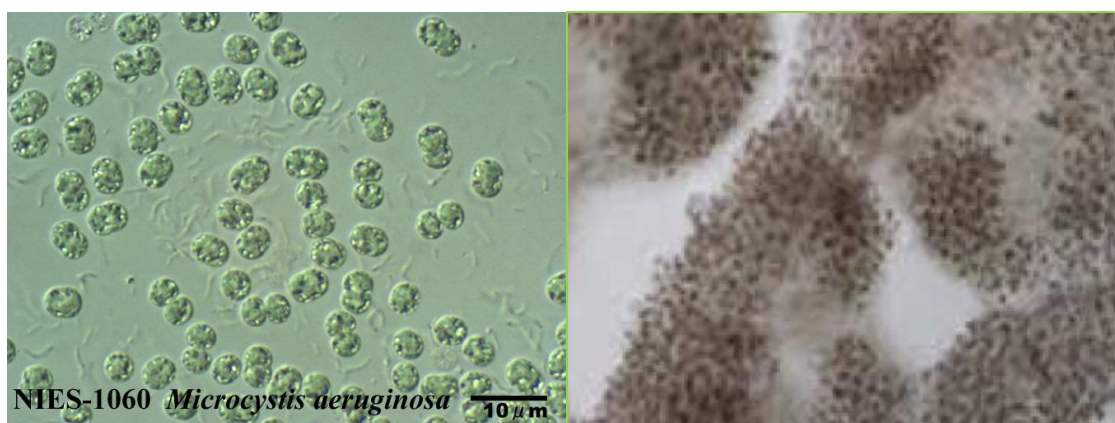


Figura 2: *Microcystis aeruginosa* (algaebase.org)

- una cepa de *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) (DtM1), Especie unicelular, de forma piriforme, de unos 15 µm de longitud, ligeramente acuminada en su extremo anterior, generalmente biflagelada (con flagelos del doble de la longitud celular), nadadora activa, uninucleada, con un par de vacuolas contráctiles, cloroplastos estrechos, con pirenoides claramente destacados. Nunca se encontró reproducción sexual en esta especie.

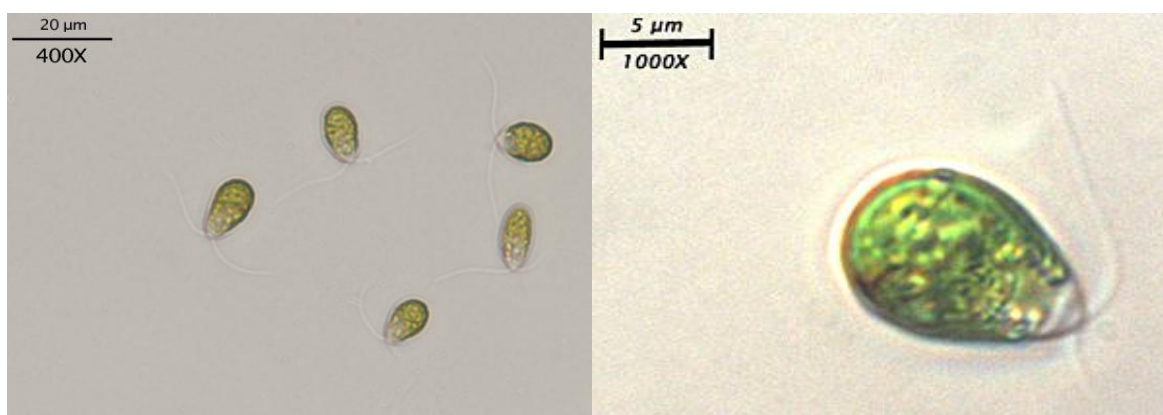


Figura 3: *Dunaliella tertiolecta* (Colección de cultivos UTEX, Texas)

Las dos primeras especies fueron aisladas de una laguna prístina en el Parque Nacional de Doñana, España, y pertenecen al fitoplancton de aguas continentales. La tercera especie, procedente de agua marina costera fue aislada de un área protegida en Bocche di Bonifacio (Isla de N. Sardegna; Italia).

En ninguna de las áreas mencionadas ni en sus proximidades, se habían descrito vertidos de crudo de petróleo antes y durante los muestreos.

Los cultivos fueron fundados a partir del aislamiento de una célula, para evitar la aparición de mutantes aleatorios que pudieran haberse acumulado en la población durante los ciclos de crecimiento anteriores al experimento.

Las microalgas mencionadas crecieron en condiciones axénicas, en cajas de cultivo Greiner (Greiner; Bio-One Inc., Longwood, 46 NJ, USA), conteniendo 20 mL de medios BG11 (Sigma-Aldrich), para *Scenedesmus* (SiD1) y *Microcystis* (MaD3), y f/2 para *Dunaliella* (DtM1). Se mantuvieron los cultivos a 22 °C, con una densidad de flujo de fotones continua de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con una longitud de onda de entre 400–700 nm, procedente de tubos fluorescentes. Las especies ensayadas fueron mantenidas en mid-log, crecimiento exponencial mediante transferencias sucesivas de inóculos de 6×10^5 células a medio de cultivo nuevo. Bajo esas condiciones, los cultivos crecieron asexualmente.

Sólo los cultivos que no contenían bacterias fueron usados en los experimentos. La ausencia de bacterias se comprobó mediante observación directa usando un microscopio de epifluorescencia, después de realizar una tinción con naranja de acridina.

Medida de la máxima respuesta a la selección tras el experimento de Ratchet.

Para estimar la respuesta de adaptación genética desarrollamos un procedimiento inspirados en las metodologías convencionales utilizados en genética cuantitativa para medir la respuesta a la selección artificial (Falconer 1981).

En primer lugar estimamos la respuesta a la selección (R) como:

$$R = \sigma_f - \sigma_0 \quad (\text{Falconer 1981})$$

donde:

σ_f : valor medio fenotípico de la población de microalgas después del experimento de Ratchet.

σ_0 : valor medio fenotípico de la población de microalgas antes del experimento de Ratchet.

En nuestro caso y justo al final de nuestro experimento de ratchet, la respuesta a la selección coincide con la máxima respuesta a la selección (Rmax) ya que el experimento de Ratchet prosiguió hasta que no se alcanzó mas respuesta.

Dado que:

$$R_{\max} = i h^2 \sigma_p \quad (\text{Falconer 1981})$$

donde: i es la intensidad de la selección, h^2 es la heredabilidad y σ_p es la desviación estándar de los valores fenotípicos de la población.

Como conocemos el valor de Rmax podemos estimar una serie de valores de interés. Podemos estimar h^2 como la pendiente de la línea de regresión entre los valores medios iniciales (antes del experimento de Ratchet) y finales (después del experimento de Ratchet).

Dado que podemos calcular directamente σ_p y conocemos todos los demás valores de la ecuación, también podemos estimar la intensidad de la selección (i).

Test de toxicidad inicial:

Se utilizaron como agentes selectivos, un estándar de petróleo (Fluka Analytical Petroleum Special Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Ch-9471, Buchs, Germany 77370), y un estándar de diesel (Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Ch-9471, Buchs, Germany Ref w1361), para asegurar la repetibilidad de los ensayos.

El estándar de petróleo utilizado contiene un 18% de hidrocarburos aromáticos. Los agentes selectivos se utilizaron en concentraciones de 0.15%, 0.45%, 1.5%, 3%, 9%, 12% diluídos en medio BG-11.

Para realizar una mezcla homogénea de los patrones de petróleo y diesel con los cultivos, el medio de cultivo junto con los agentes selectivos de fueron sonicados con pulsos de 10 segundos cada uno, con una potencia de 40W y una frecuencia de 16, con un sonicador Vibra Cell (Sonics & Materials, Inc., Danbury, USA), manteniendo los tubos en un baño de hielo picado durante el proceso, para evitar el calentamiento de los tubos.

Se analizó el efecto de las concentraciones crecientes de petróleo o diesel sobre la eficiencia fotosintética de las cepas de SiD1 y DtM1, midiendo los cambios en el rendimiento cuántico del fotosistema II (ϕ_{PSII}).

Se realizaron medidas utilizando un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada (ToxY-PAM fluorimeter Walz, Effeltrich, Germany), sobre triplicados de muestras expuestas a petróleo. Las medidas fueron tomadas 48 horas después de la adición de petróleo para asegurar la exposición completa de los cultivos al agente selectivo durante un ciclo completo. El rendimiento cuántico efectivo se calculó como sigue:

$$\phi_{PSII} = \frac{F'_m - F_t}{F'_m}$$

Donde F'_m (fluorescencia máxima bajo luz actínica constante) y F_t (fluorescencia en estado estable de la clorofila) son los valores máximos de fluorescencia de células adaptadas a la luz, respectivamente (Schreiber et al., 1986).

El efecto tóxico del petróleo o del diesel fue estimado calculando la tasa de crecimiento máxima de aclimatación (r), en muestras triplicadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial, en presencia de concentraciones crecientes de petróleo de acuerdo con la ecuación del experimento de Crow and Kimura (1970):

$$r = \frac{\log(N_t/N_0)}{t}$$

donde N_t y N_0 representan el número de células al principio y al final del experimento, y $t = 5$ días es el tiempo que los cultivos fueron expuestos a concentraciones crecientes del agente selectivo.

Tanto los controles como los cultivos experimentales fueron contados usando un microscopio invertido (Axiovert 35; Zeiss) y un hemocitómetro.

Análisis de Fluctuación:

El análisis de fluctuación permite conocer la naturaleza de la mutación y distinguir entre dos modelos generales:

Modelo 1: la mutación es preadaptativa preselectiva y general.

Modelo 2: la mutación es postadaptativa, postselectiva y específica.

Se llevó a cabo un análisis de fluctuación modificado para cultivos líquidos de fitoplancton, (Costas et al., 2001; Lopez-Rodas et al., 2001), en los cultivos de microalgas de las especies de estudio, con dosis de agentes selectivos superiores a las dosis letales encontradas en el experimento anterior, para analizar la naturaleza de la mutación que confiere la resistencia, al petróleo y al diesel (Fig. 4).

Para el Set 1, se inocularon 50 tubos de cultivo de pyrex estériles (Pyrex, Barloworld Scientific Ltd, Stone, UK), de 13 mL, con una población de $N_0 = 10^2$ células salvajes de *M. aeruginosa* (MaD3), *D. tertiolecta* (DtM1) y *S. intermedius* (SiD1).

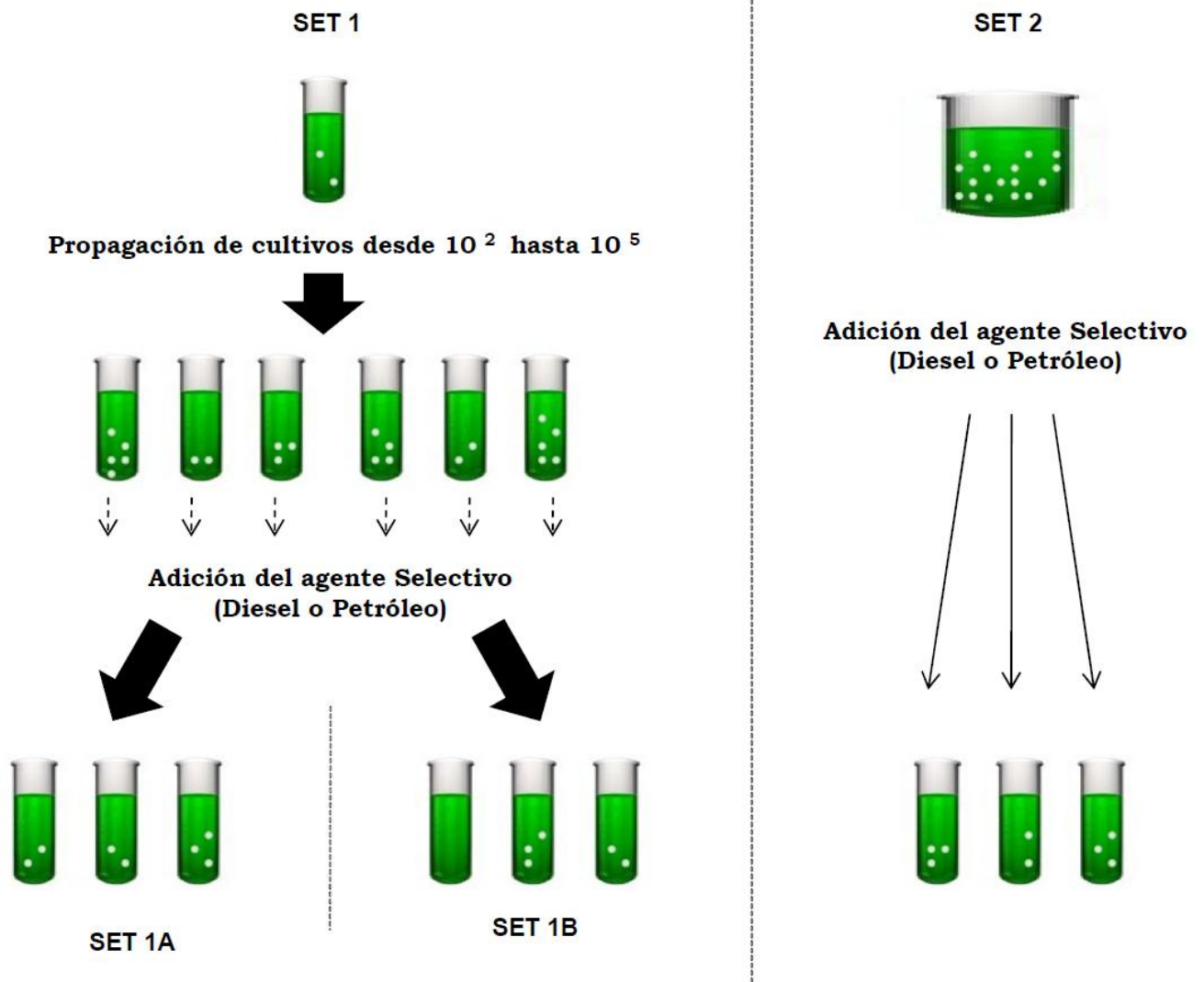


Figura 4: Esquema del análisis de fluctuación.

Este pequeño número de células es suficiente para prácticamente asegurar que no existen mutantes a priori, en la población de estudio.

Los cultivos crecieron axénicamente en 4mL de medio BG11, bajo condiciones no selectivas. Cuando cada uno de los cultivos adquirió el número de células apropiado para comenzar el experimento de fluctuación ($N_t \approx 10^5$ células), se añadió el agente selectivo (petróleo o diesel). El análisis de fluctuación fue llevado a cabo usando 3 concentraciones diferentes de petróleo y diesel (3%, 9% and 21%, v/v petróleo o diesel /agua, respectivamente). Simultáneamente, en el Set 2, se fundaron los controles, en 25 tubos de cultivo de pyrex estériles (Pyrex, Barloworld Scientific Ltd, Stone, UK), inoculados con una población de 10^5 células de SiD1, MaD3 o DtM1, respectivamente, de cada una poblaciones experimentales iniciales.

Se añadió el agente selectivo (petróleo o diesel), usando las mismas concentraciones que en el Set 1. Una vez preparados todos los cultivos experimentales, éstos se dejaron crecer bajo condiciones selectivas durante 60 días, para asegurar que una sola célula mutante de las que pudiera aparecer fuera capaz de generar suficiente descendencia como para ser detectada. Las células resistentes encontradas en cada uno de los cultivos se contaron utilizando un microscopio invertido. Cada uno de los cultivos se contó “a ciegas”, al menos por dos personas distintas.

De acuerdo con Luria y Delbrück (1943), podemos encontrar dos resultados independientes, como consecuencia de dos fenómenos de adaptación (Fig. 4). En primer lugar, podemos encontrar células resistentes que aparecen como raras mutaciones pre-selectivas (modelo 1), que ocurren al azar durante la época en que los cultivos crecieron de N_0 a N_t antes de la exposición al petróleo o al diesel; estas mutaciones pueden ocurrir antes en algunos cultivos, más tarde en otros o pueden no ocurrir en absoluto.

En contraste, si las células resistentes surgieron como mutaciones post-selectivas (modelo 2), inducida por el agente selectivo, cualquiera de las células es capaz de adquirir esta resistencia, puesto que las células han adquirido resistencia después de la adición del agente selectivo. Por lo tanto, la variación en el número de células resistentes por cultivo sería semejante.

Los cultivos pertenecientes al Set 2, constituyen los controles para el análisis de fluctuación (Fig. 4).

Si la relación entre la varianza y la media del Set 1 es significativamente mayor que la relación entre la varianza y la media del Set 2, entonces podremos decir que ha habido fluctuación. Lo cuál confirmaría que las células resistentes han surgido de raras mutaciones pre-adaptativas, anteriores a la exposición del agente selectivo.

Si los resultados nos muestran una relación semejante entre la varianza y la media entre el Set 1 y el Set 2, entonces podremos deducir que no ha habido fluctuación. Lo que confirmaría que las células resistentes se han desarrollado debido a mutación inducida por la exposición al agente selectivo.

El último resultado posible que podemos encontrar, es que no haya resistentes en ninguna de los cultivos; lo que nos indicaría que ni la selección de mutantes espontáneos, que aparecen antes de la exposición al agente selectivo, ni ninguna adaptación específica, se ha producido durante el crecimiento de los cultivos.

El análisis de fluctuación permite también estimar la tasa de mutación como:

$$\mu = -\frac{\log_e P_0}{N_t - N_0} \text{ (Luria and Delbrück, 1943)}$$

donde el parámetro P_0 representa la proporción de cultivos del Set 1 que no tiene células resistentes.

Mejora y selección de organismos resistentes mediante el sistema de ratchet:

El sistema experimental de ratchet utilizado tiene como finalidad alcanzar el equilibrio entre una fuerte intensidad de selección, motivada por la acción de dosis crecientes de los agentes selectivos (petróleo y diesel) sobre los cultivos de estudio, y el mantenimiento de un tamaño de la población lo suficientemente grande como para aumentar la probabilidad de raras mutaciones espontáneas que les confieren adaptación a los agentes selectivos utilizados.

Las mutaciones que confieren resistencia a los cultivos ocurren aleatoriamente (como se ha podido comprobar en el análisis de fluctuación), y los cultivos que las presentan deben ser sometidos al siguiente nivel del ciclo de ratchet sólo cuando su concentración en la población total, es tal que, permite el crecimiento, además de soportar diferentes niveles de selección. Este procedimiento permite estimar la máxima capacidad de adaptación de una especie bajo concentraciones crecientes de los agentes selectivos. (Reboud et al., 2007; Huertas et al., 2010, 2011).

Durante la fase inicial, se prepararon los cultivos control, que contienen medio de cultivo, las 3 especies analizadas, y 3 cultivos experimentales para cada una de las concentraciones de petróleo o diesel. Las concentraciones iniciales de los agentes selectivos empleados fueron las siguientes: 0.15, 0.45 and 1.5% (v/v), todas ellas diluídas en medio de cultivo BG11, como se describió anteriormente. Cada uno de los cultivos se preparó en un tubo con tapa de rosca permeable (BRAND, Otto-Schott Str. 2597877 Wertheim, Germany), con 20mL de medio BG11, inoculados con 6×10^5 células de tipo salvaje procedentes de las cepas de SiD1 y DtM1, obtenidas mediante el crecimiento exponencial de los cultivos iniciales. El número inicial de células elegido es suficiente para obtener una población grande al final del experimento. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones selectivas durante 20 días, en cada ciclo de ratchet, y luego se analizaron los resultados obtenidos.

El periodo de tiempo de duración del experimento es lo suficientemente largo para permitir a los cultivos alcanzar una alta densidad celular.

Bajo esas condiciones, la concentración de células fue contada y comparada con los resultados obtenidos entre los controles y los cultivos experimentales sometidos a los agentes selectivos. Si la concentración en los tubos tratados con agentes selectivos es similar a la de los controles, podemos decir que la población ha alcanzado un crecimiento significativo. Por lo que dicha población, será transferida al siguiente ciclo de ratchet, y expuesta a una concentración mayor de los agentes selectivos (Fig. 5). Los cultivos que no alcanzan un crecimiento semejante al observado en los controles no se transfieren.

Cada ciclo de ratchet conlleva un incremento de tres veces la concentración de agentes selectivos de los empleados en la dosis del ciclo anterior.

El experimento consta de tres replicados de cultivos de control, y tres replicados de cultivos para cada una de las 3 dosis iniciales de agente selectivo, para cada uno de los ciclos de ratchet. Cada tubo es transferido hasta la siguiente concentración cuando el crecimiento neto del cultivo con agente selectivo coincide con el crecimiento de su correspondiente control (los tubos se encuentran representados en la figura en la parte lateral derecha).

Los cultivos que no presentaban crecimiento neto fueron mantenidos en la misma concentración. Se considera como un ciclo de ratchet cada vez que se transfieren los tubos control. El experimento finaliza después de 6 ciclos, donde podemos observar crecimiento neto en los controles. La máxima capacidad de adaptación corresponde a la concentración máxima del agente selectivo, donde podemos observar crecimiento neto.

Los siguientes ciclos del tratamiento corresponden a dosis de petróleo y diesel de 2%, 3%, 4%, 6%, 9%, 12%, 16%, 21% y 30% (v/v), diluidas en el medio de cultivo, como se ha descrito anteriormente.

Cada cultivo individual presenta una probabilidad aleatoria de mutaciones particulares beneficiosas, las cuáles pueden surgir individualmente. Consecuentemente, cada cultivo individual, fue tratado como una población individual. Por lo tanto, si un cultivo tratado con petróleo o diesel alcanza el crecimiento observado en los cultivos control, se transfiere al siguiente ciclo de ratchet.

MATERIAL Y MÉTODOS

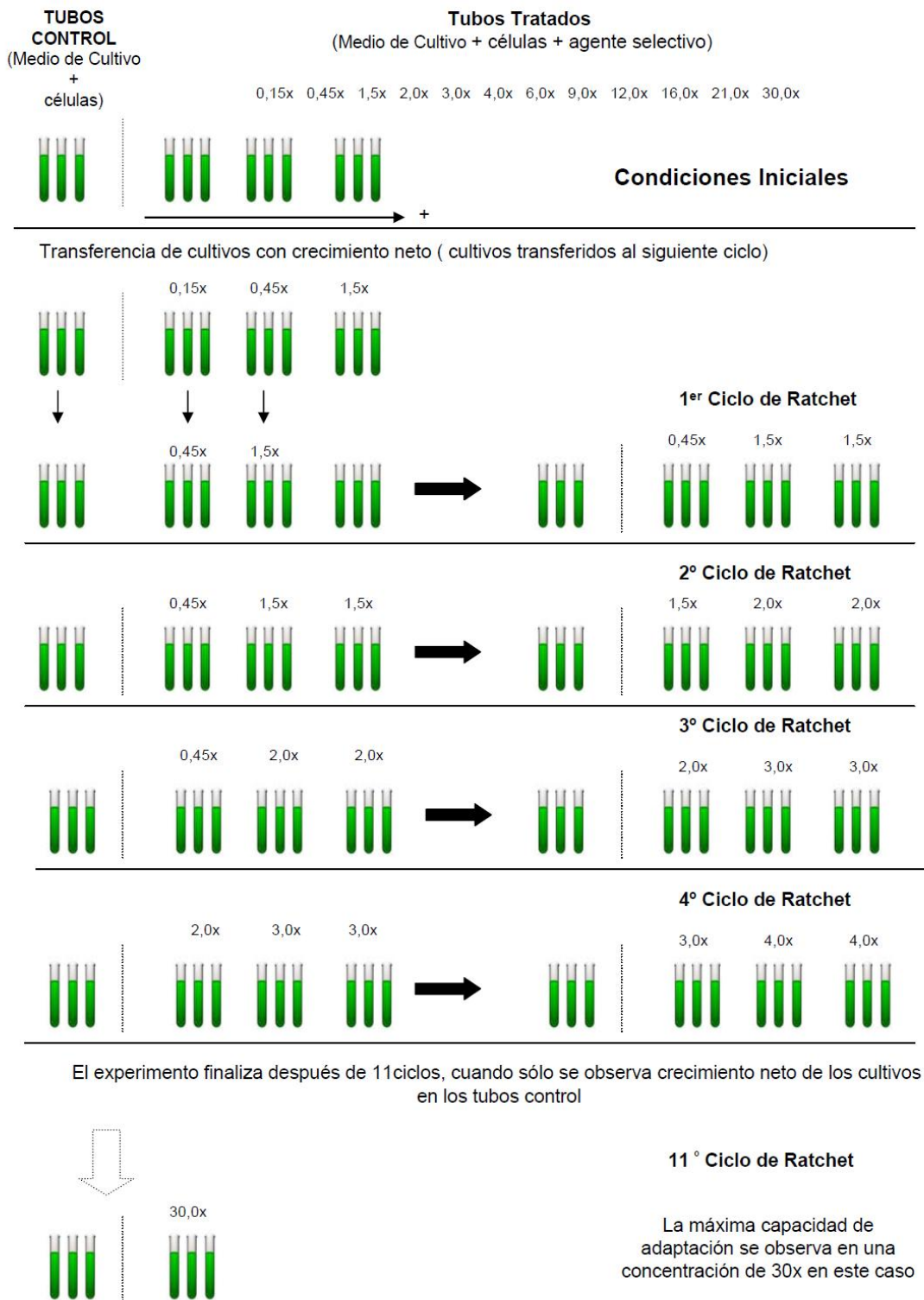


Figura 5: Esquema del experimento de ratchet.

Tanto los cultivos tratados con petróleo como los tratados con diesel, fueron inoculados a los siguientes ciclos correspondientes con idénticas concentraciones en el número de células, semejantes a las usadas en el ciclo inicial de fundación del experimento (6×10^5 células). Se consideró el último ciclo de ratchet cuando no se observó crecimiento de células en un cultivo específico después de un periodo de 90 días.

Para estimar el número de generaciones durante el experimento de ratchet se utilizó la ecuación clásica de Novick y Szilard (1950):

$$N_t = N_0 2^{t/T} \quad g = \frac{t}{T}$$

donde:

N_t : es el número de células a tiempo= t

N_0 : es el número de células a tiempo $t=0$

t : es el tiempo

T : es el tiempo necesario para que prolifere una generación

g : es el número de generaciones

Test de toxicidad final:

Finalmente, se evaluó el efecto tóxico de las concentraciones de 9%, 12%, 16%, 21%, y 30% (v/v) de petróleo o diesel en la eficiencia fotosintética y en la tasa de crecimiento de los cultivos derivados obtenidos mediante el experimento de ratchet, midiendo la eficiencia fotosintética para las cepas de tipo salvaje antes y después del experimento de ratchet y comparándola con las obtenidas para los cultivos expuestos a los agentes selectivos.

La concentración máxima que llevó al crecimiento de cultivos derivados obtenida al final de los ciclos de ratchet, proporciona la estimación de la capacidad máxima adaptación del cultivo antes mencionado.

5.2. Medida de la máxima respuesta a la selección tras el experimento de Ratchet.

La herencia entendida como el pool genético que se transmite a lo largo de las generaciones, es fácilmente caracterizable en la mayoría de los individuos, sin embargo estimar como estos caracteres van a manifestarse en los individuos de una población, resulta algo más complicado.

La importancia relativa de la influencia que los efectos que el entorno provoca en la manifestación fenotípica de los caracteres cuantitativos, junto con la herencia genética que poseen los individuos, constituye el estudio de las heredabilidades.

La contribución que el entorno realiza en la heredabilidad es difícilmente medible debido a todos los factores que pueden intervenir o interaccionar dando lugar a los distintos fenotipos procedentes de un mismo genotipo.

Hasta el momento, se han realizado estudios de heredabilidades en organismos diploides, con resultados relativamente satisfactorios. Se trata, en estos casos, de poblaciones mendelianas en las que hay reproducción sexual, y por lo tanto recombinación.

El caso de la mayoría de las especies fitoplanctónicas es radicalmente distinto a las anteriores, debido a que, en general, no se trata de poblaciones mendelianas porque se reproducen asexualmente y no hay recombinación.

En el fitoplancton, normalmente, encontramos diferentes genotipos dentro de una misma población; su distinción y separación es una tarea compleja e inabordable en la mayoría de las ocasiones, por lo que la medida de la heredabilidad en este tipo de organismos, no ha sido hasta ahora abordada.

Con los datos obtenidos en los experimentos anteriores podemos realizar un estudio de la medida de la máxima respuesta a la selección de los organismos de ensayo, frente a los contaminantes antropogénicos utilizados (petróleo y diesel), es decir, podemos medir la heredabilidad de la eficacia biológica (fitness) en la población estudiada.

Esto es posible, porque partimos de un sólo genotipo, en especies con reproducción asexual, por lo tanto sin recombinación, y en las que la única fuente posible de variabilidad genética, que permita la supervivencia superado el umbral de la adaptación fisiológica, es la mutación.

En este trabajo de investigación se han desarrollado procedimientos inspirados en las metodologías convencionales, utilizados en genética cuantitativa, para medir, por primera vez, la respuesta a la selección y la heredabilidad, en organismos fitoplanctónicos, mejorados mediante selección artificial (Falconer 1981).

En primer lugar estimamos la respuesta a la selección (R) como:

$$R = \sigma_f - \sigma_0 \quad (\text{Falconer 1981})$$

donde:

σ_f : valor medio fenotípico de la población de microalgas después del experimento de Ratchet.

σ_0 : valor medio fenotípico de la población de microalgas antes del experimento de Ratchet.

En nuestro caso y justo al final de nuestro experimento de ratchet, la respuesta a la selección coincide con la máxima respuesta a la selección (Rmax) ya que el experimento de Ratchet prosiguió hasta que no se alcanzó más respuesta, es decir, hasta que el crecimiento observado a la dosis de contaminante fue nulo.

Dado que:

$$R_{\max} = i h^2 \sigma_p \quad (\text{Falconer 1981})$$

donde:

i: intensidad de la selección.

h^2 es la heredabilidad.

σ_p : desviación estándar de los valores fenotípicos de la población.

Como conocemos el valor de R_{max} podemos estimar una serie de valores de interés.

La estimación de h^2 puede calcularse como la pendiente de la línea de regresión entre los valores medios iniciales (antes del experimento de Ratchet) y finales (después del experimento de Ratchet).

Los valores de o_p pueden calcularse directamente y se conocen todos los demás valores de la ecuación, por lo que podemos estimar la intensidad de la selección (i), mediante la ecuación anterior.

5.3. Aplicaciones de los microorganismos obtenidos por selección artificial a distintos problemas de biorremediación de contaminantes antropogénicos

Una vez seleccionados organismos resistentes con la máxima capacidad de adaptación a los contaminantes antropogénicos elegidos petróleo y diesel, proponemos en este trabajo de investigación una nueva aproximación para la biorremediación de los vertidos de petróleo, concretamente, para biodegradación de sus componentes más tóxicos y reaclitrantes, los hidrocarburos.

Organismos experimentales y condiciones de cultivo:

Para realizar estos experimentos los organismos elegidos debían tener dos características principales y diferenciadoras de las bacterias:

Ser productores primarios, es decir, iniciadores de cadenas tróficas, por lo que no necesitan ser eliminados del ecosistema acuático una vez utilizados.

Ser organismos fotosintéticos, disminuyendo la cantidad de CO₂ en la atmósfera y aumentando los niveles de oxígeno.

Estas dos características permitirán que la biorremediación no sólo aumente la densidad fitoplanctónica de la zona que reciba el tratamiento, creando nuevas cadenas tróficas, recuperando así la riqueza del ecosistema, sino también contribuirá a la recuperación de los niveles de oxígeno y CO₂ a nivel global.

Los organismos utilizados para realizar estos estudios, que cumplen las condiciones anteriormente mencionadas, proceden de una muestra de agua en Arroyo Minero de Arriba, Niriñuan, Río Negro, Argentina. Se trata de clorofitas unicelulares (microalgas), que fueron identificadas por taxónomos como *Scenedesmus obtusus* y *Scenedesmus rapaporti*.

Scenedesmus obtusus (Meyen, 1829). Chlorophyceae, Chlorococcales, Oocystaceae. Cenobio normalmente de 2 a 4 células (raramente 8 o más) normalmente unidas. Las colonias de 4 están unidas en un plano horizontal y desplazadas en el eje. Las células son ovoides con un diámetro mayor de 7.5 μm y un diámetro menor de 6.5 μm . La densidad celular de estas especies fue de 9.200 ± 700 células ml^{-1} (algaebase.org).

Scenedesmus rapaporti Chlorophyceae, Chlorococcales, Oocystaceae. Especie con un cenobio de 2 a 4 células en colonias unidas en un mismo plano y las células desplazadas del eje. Las células son más esféricas (solo ligeramente ovaladas) con un diámetro mayor de alrededor de 5.5 μm y un diámetro menor de alrededor de 5.0 μm . La densidad celular de estas especies fue de 7.200 ± 300 células ml^{-1} (López-Rodas et al., 2009).



Figura 6: *Scenedesmus obtusus*



Figura 7: *Scenedesmus rapaporti*

Las especies procedentes de las muestras recogidas de la expedición de Arroyo Minero, se aislaron y cultivaron para poder realizar posteriores estudios tanto de sus morfologías, como de sus características más insólitas, debido a su crecimiento y evolución en un ambiente extremo contaminado por un vertido natural de petróleo que se remonta a 1915.

Para el aislamiento de las especies encontradas se utilizaron dos métodos:

Aislamiento directo: utilizando micropipetas con un micromanipulador Zeiss-Eppendorf conectado a un microscopio invertido (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Procedimientos de diluciones sucesivas en placas multiensayo estériles de poliestireno.

Una vez aisladas las cepas fueron re-clonadas mediante el aislamiento de una sola célula.

Las cepas fueron cultivadas en frascos de 100 ml de cultivo celular con tapa aireadora (Greiner Bio-One Inc Longwood, Nueva Jersey, EE.UU.), con 20 ml de medio de cultivo comercial BG-11 (Sigma Aldrich Química, Taufkirchen, Alemania), bajo luz continua de 60 micromol m⁻² s⁻¹ de longitud de onda de 400 a 700 nm proporcionada por tubos fluorescentes day-light (Phillips TLD 36W/ 33, Francia), a 20 °C en cámaras de cultivo (Cámaras de Crecimiento, Modelo AGP, Ing. Climas, C / Industria 498-500, 08918 Badalona, Barcelona, España).

El medio de cultivo BG-11 (Sigma-Aldrich-Fluka) fue preparado con agua destilada (Elix 3uV Millipore) según instrucciones del fabricante en una cabina de flujo laminar para impedir la presencia de bacterias y filtrado a través de filtros estériles (Stericup, Millipore) de 0,22 micras de poro. Los cultivos se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial mediante transferencias de un inóculo a nuevas cajas con medio de cultivo nuevo una vez cada 30 días.

Las cepas aisladas fueron añadidas a la colección de cultivo de microalgas del Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Complutense de Madrid.

Como en todos los casos anteriores, antes de la realización de los experimentos, los cultivos fueron clonados a partir de una sola célula para prevenir el crecimiento de mutantes espontáneos que podrían haber aparecido en los cultivos iniciales.

Para la realización de los experimentos, los cultivos utilizados, procedentes de la colección, fueron mantenidos en fase de crecimiento exponencial mediante transferencias seriadas de alícuotas de 1-3 ml con nuevo medio de cultivo BG-11 una vez al mes. Generándose las réplicas correspondientes 3P correspondiente a *Scenedesmus obtusus* y 4P correspondiente a *Scenedesmus rapaporti*.

La nomenclatura 3P y 4P, proviene del nombre con el que se encuentran registradas las cepas utilizadas, en el Banco Español de Algas para Patentes:

Sc3P: *Scenedesmus obtusus*.

Sc4P: *Scenedesmus rapaporti*.

La ausencia de bacterias en los cultivos se confirmó semanalmente mediante tinción con naranja de acridina de una muestra del cultivo, ésta fue observada con un microscopio de epifluorescencia.

Análisis de biodegradación y/o bioacumulación de petróleo y derivados

El objetivo de este trabajo experimental fue comprobar si las especies utilizadas eran capaces de degradar los hidrocarburos procedentes del petróleo, y si la tasa de degradación de hidrocarburos era igual en ambas especies: *Scenedesmus obtusus* y *Scenedesmus rapaporti* (nueva especie aislada del muestreo).

Para ello se fundaron cultivos de estas especies con un 5% de Fluka Analytical Petroleum Special, con el siguiente diseño experimental (figura 8).

Se prepararon 4 controles que contenían un 5% de Fluka Analytical Petroleum Special, en BG-11, y 2 series (una por cada especie microalgal) de cuatro muestras cada una, procedentes de los cultivos de las dos especies mencionadas anteriormente, con un contenido del patrón de petróleo igual que en el caso de los controles.

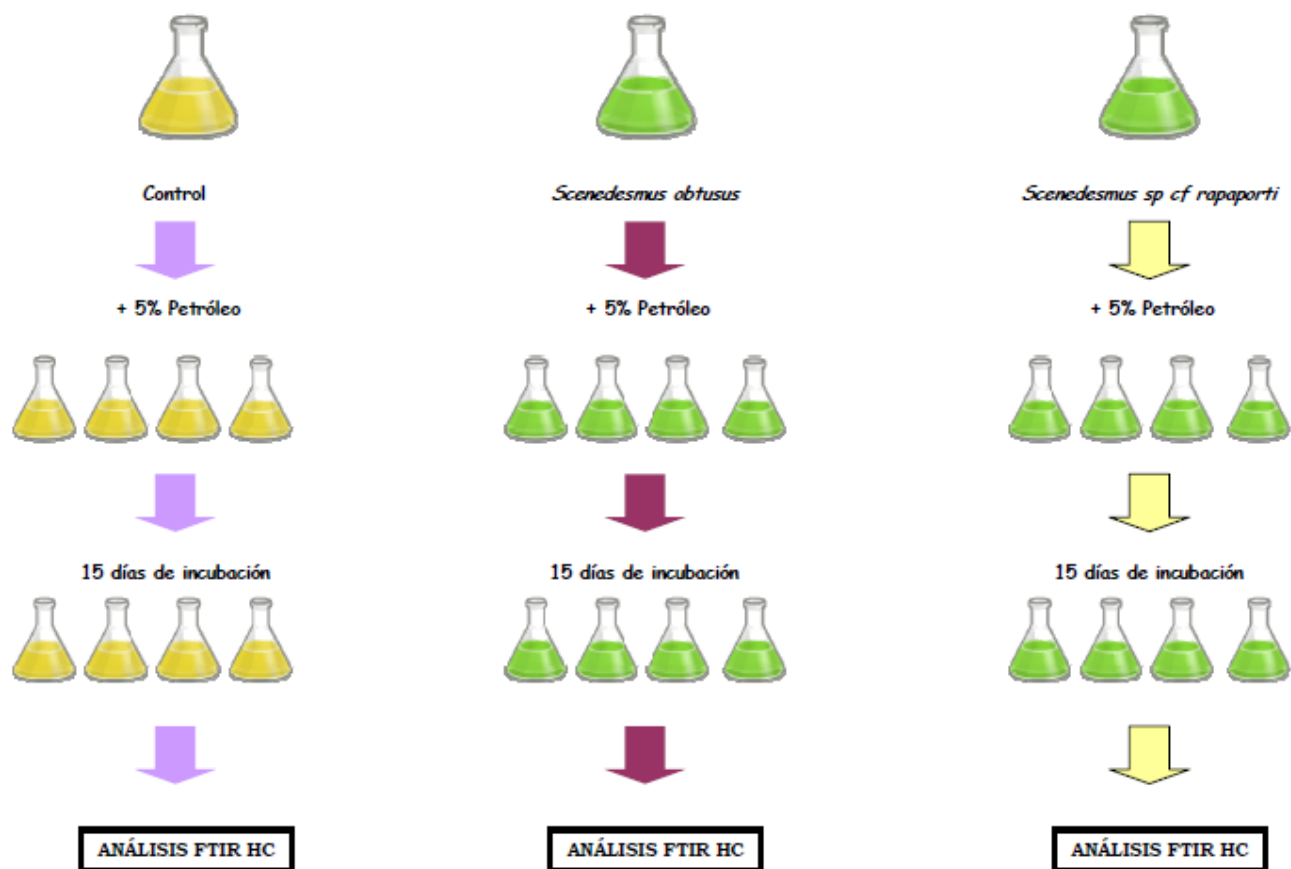


Figura 8: diseño esquemático del experimento de biodegradación y/o bioacumulación de petróleo

El petróleo es insoluble en agua, por lo que para asegurar que éste se homogeneizaba en toda la muestra preparada para el experimento, previamente a la adición de las microalgas, en el caso de las muestras de los cultivos, y en todas las muestras de los controles, las preparaciones fueron sonicadas con Vibra Cell (Sonics & Materials Inc., Danbury CT, USA). El patrón de sonicación fue de 4 pulsos cada 20 segundos, con una potencia de 40 watos y a una frecuencia de 16kHz.

Una vez añadidas las microalgas, los cultivos preparados, se incubaron en una cámara de cultivo durante 15 días a una temperatura de 22°C.

Transcurridos los 15 días correspondientes al experimento se filtraron las muestras, para eliminar la biomasa algal y cualquier otra materia sólida presente en las mismas. Como filtro se utilizó una red de plancton, en primer lugar, y posteriormente un filtro de jeringa de 0.22 μ m de los que se obtuvieron los extractos acuosos para el posterior análisis de la tasa degradación de hidrocarburos.

Los extractos acuosos obtenidos se analizaron bajo un método basado en la norma ASTM 3921 (Standard Test Method for Oil and Grease and Petroleum Hydrocarbons in Water) y el método EPA 418b (Petroleum Hydrocarbons (Spectrophotometric, Infrared)).

Diseño estadístico:

De los datos obtenidos en los experimentos realizados se efectuó un análisis estadístico, basado en conceptos no paramétricos.

Los objetivos principales del análisis estadístico efectuado, fueron:

- Determinar si hubo biodegradación, evaluando la existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos en los experimentos realizados, para los controles y para las dos especies estudiadas.
- Calcular las tasas de biodegradación.
- Determinar si existen diferencias entre las tasas de biodegradación de las dos especies estudiadas, comparando los resultados obtenidos en los experimentos entre las dos especies entre sí.

Para estudiar si existía o no biodegradación, se utilizó un test H de Kruskal-Wallis no paramétrico, utilizando el paquete estadístico GraphPadInstat (GraphPad, Inc) para Apple.

El cálculo de las tasas de biodegradación se obtuvo comparando los resultados de la cantidad de petróleo contenida en los controles sin células y los cultivos experimentales, para determinar la bioeliminación /biodegradación correspondiente a las especies elegidas.

Para evaluar si había diferencias entre las tasas de bioeliminación/biodegradación se utilizó un test “a posteriori” (test de Dunn) que analiza las diferencias por pares de tratamientos y posteriormente se empleó un remuestreo por bootstrapping (remuestreo con 150 valores), para corroborar los resultados obtenidos en el Test de Dunn.

No se empleó un ANOVA (Análisis de Varianza) paramétrico al no cumplirse las condiciones de normalidad (distribución normal de los resultados), homocedasticidad (homogeneidad de las varianzas), etc., requeridas para su aplicación.

La aplicación de estos tratamientos estadísticos proporciona un análisis cuantitativo de resultados, que permite corroborar si existe o no bioeliminación/biodegradación y cuál es la tasa de bioeliminación/biodegradación de cada uno de los microorganismos ensayados.

6. RESULTADOS

"Si no quieres obtener los mismos resultados no hagas siempre lo mismo"

Albert Einstein

6.1. Mecanismos de adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos: petróleo y diesel.

Resultados del Test de toxicidad inicial

Según los resultados obtenidos en los experimentos realizados, podemos decir que tanto el estándar de petróleo (Fluka Analytical Petroleum Special Standard), como el estándar de diesel (Diesel Oil Standard), son extremadamente tóxicos para todas las especies ensayadas. (Tabla 1)

Concentraciones de petróleo y diesel de tan sólo 0.45% (v/v) producen una inhibición considerable de la fotosíntesis (ϕ PSII) en todas las especies analizadas.

Los efectos adversos se incrementan drásticamente para concentraciones de 1.50% (v/v). El petróleo parece ser más tóxico que el diesel según los datos encontrados.

Dosis	% Inhibición del ϕ PSII (media + desviación estándar)					
	Patrón de Petróleo			Patrón de Diesel		
	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	DtM1	MaD3
0% (control)	0	0	0	0	0	0
0.15 %	3±0	1±0	8±2	4±0	3±1	8±1
0.45 %	13±1	19±1	28±5	13±1	20±1	26±3
1.50 %	25±2	28±1	79 ± 4	19±1	27±1	70 ± 9
3 %	28±1	32±2	100	23±2	31±3	100
9 %	50±1	84±9		31±2	85±11	
12 %	81±1	100		100	85±3	

Tabla 1: Test de toxicidad inicial: efectos en el incremento de dosis de patrones de petróleo y diesel en la fotosíntesis (actividad de ϕ PSII)

RESULTADOS

Los efectos tóxicos del petróleo y del diesel demostraron un amplio grado de variación interespecífica. Una concentración del 3% (v/v) de cada uno de los agentes selectivos es capaz de inhibir el 100% de la actividad de ϕ PSII y el crecimiento de la cepa de MaD3 (Cyanobacteria). En contraste con estos resultados, se requieren concentraciones de 9% y 12% (v/v) de petróleo o diesel para inhibir el 100% de la actividad de ϕ PSII y el crecimiento de la cepa DtM1 y SiD1, respectivamente. (Tabla 1 y Tabla 2)

Dosis	% Tasa de Crecimiento (r) (media + desviación estándar)					
	Patrón de Petróleo			Patrón de Diesel		
	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	DtM1	MaD3
0% control	0.74±0.05	0.61±0.03	0.53±0.05	0.74±0.05	0.61±0.03	0.53±0.05
0.15 %	0.73±0.2	0.61±0.04	0.42±0.05	0.72±0.04	0.60±0.03	0.45±0.02
0.45 %	0.68±0.03	0.53±0.002	0.16±0.04	0.69±0.01	0.56±0.04	0.18±0.03
1.50 %	0.36±0.06	0.29±0.08	0.09±0.05	0.45±0.05	0.31±0.10	0.07±0.03
3 %	0.31±0.11	0.26±0.10	No hay crecimiento	0.37±0.03	0.28±0.07	No hay crecimiento
9 %	0.04±0.03	No hay crecimiento		0.11±0.04	No hay crecimiento	
12 %	No hay crecimiento			No hay crecimiento		

Tabla 2: tasa de crecimiento (r), de las cepas de *Scenedesmus intermedius* (SiD1), *Dunaliella tertiolecta* (DtM1) and *Microcystis aeruginosa* (MaD3) anteriores al experimento de ratchet. Dosis expresadas en v/v (petróleo o diesel /medio de cultivo).

Resultados del análisis de fluctuación:

Se obtuvieron tres resultados distintos para el análisis de fluctuación de las cepas de MaD3, DtM1 y SiD1 bajo condiciones crecientes de petróleo y diesel (Tabla 1 y Tabla 2).

Las microalgas responden por medio de aclimatación fisiológica en las concentraciones más bajas de de petróleo o diesel (3% en el caso de DtM1; 3% y 9% en el caso de SiD1). Las células resistentes fueron capaces de crecer en todos los cultivos de los experimentos del 1 Set y Set 2 y no se observó ninguna fluctuación (varianza/media ≈ 1 constante con variabilidad de Poisson ($p < 0.05$, usando un test χ^2 de bondad de ajuste).

Las microalgas se adaptan mediante raras mutaciones aleatorias para concentraciones medias de los agentes selectivos considerados, petróleo y diesel (3% en el caso de MaD3, 9% en el caso de DtM1 y 21% en el caso SiD1).

En estos casos, la densidad celular se redujo drásticamente en cada cultivo experimental debido a la destrucción de células sensibles. Sin embargo, después de la incubación adicional durante varias semanas, varios cultivos recuperaron la densidad celular, debido al crecimiento de variantes resistentes al petróleo o al diesel.

En el caso de Set 1, sólo algunos cultivos se recuperaron después de 60 días de la exposición (tabla 2). En todos los cultivos del Set 1, la varianza excede significativamente a la media (varianza/media > 1 ; $p < 0.001$, usando un test χ^2 de bondad de ajuste). En contraste con estos resultados, cada uno de los cultivos del Set 2 se recuperaron de la exposición y se pudieron detectar un número similar de células resistentes en cada uno de los cultivos (Tabla 1 y Tabla 2).

Los resultados correspondientes a una alta fluctuación encontrada en los cultivos del Set 1 se considera razonable porque podría deberse a distintos procesos de errores de muestreo, que permiten inferir que las células resistentes a petróleo surgieron debido a las raras mutaciones, espontáneas ocurridas previamente a la exposición a los agentes selectivos.

La tasa de mutación estimada (r) desde cultivos sensibles a resistentes, a petróleo y a diesel observada fue de 1.2×10^{-5} y 1.8×10^{-5} mutantes por división de célula (Tabla 2).

Las microalgas de las especies ensayadas son capaces de crecer (no de adaptarse) en presencia de altas concentraciones de petróleo y diesel (9% y 21% en el caso de MaD3, y 21% en el caso de DtM1).

RESULTADOS

M. aeruginosa (Ma3D)

	% Patrón de Petróleo (V/V)					
	3%		9%		21%	
	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2
Nº de cultivos replicados	50	25	50	25	50	25
Nº de cultivos con 0 células resistentes	9	-	50	25	50	25
desde 1 a 10 ⁴	34	25	-	-	-	-
> 10 ⁴ cél. resistentes	7	-	-	-	-	-
Fluctuación	Sí		No		No	
Mecanismo de Adaptación	Mutación		Ninguno		Ninguno	
Tasa de mutación (μ)	1,7x 10 ⁻⁵					

	% Patrón de Diesel (V/V)					
	3%		9%		21%	
	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2
Nº de cultivos replicados	50	25	49	25	50	25
Nº de cultivos con 0 células resistentes	8	-	49	25	49	25
desde 1 a 10 ⁴	31	25	-	-	-	-
> 10 ⁴ cél. resistentes	11	-	-	-	-	-
Fluctuación	Sí		No		No	
Mecanismo de Adaptación	Mutación		Ninguno		Ninguno	
Tasa de mutación (μ)	1,8x 10 ⁻⁵					

Tabla 3: Resultados del análisis de fluctuación de *M. aeruginosa* en Patrón de petróleo y Diesel

RESULTADOS

***D. tertiolecta* (DtM1)**

	% Patrón de Petróleo (V/V)					
	3%		9%		21%	
	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2
Nº de cultivos replicados	50	25	50	25	50	25
Nº de cultivos con 0 células resistentes	-	-	15	-	50	25
desde 1 a 10 ⁴	-	-	38	25	-	-
> 10 ⁴ cél. resistentes	50	25	7	-	-	-
Fluctuación	No		Sí		-	
Mecanismo de Adaptación	Adaptación fisiológica		Mutación		Ninguno	
Tasa de mutación (μ)			1,2x 10 ⁻⁵			

	% Patrón de Diesel (V/V)					
	3%		9%		21%	
	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2
Nº de cultivos replicados	50	25	50	25	50	24
Nº de cultivos con 0 células resistentes	-	-	13	-	50	24
desde 1 a 10 ⁴	-	-	38	25	-	-
> 10 ⁴ cél. resistentes	50	25	9	-	-	-
Fluctuación	No		Sí		-	
Mecanismo de Adaptación	Adaptación fisiológica		Mutación		Ninguno	
Tasa de mutación (μ)			1,3x 10 ⁻⁵			

Tabla4 : Resultados del análisis de fluctuación de *D. tertiolecta* en Patrón de petróleo y Diesel

RESULTADOS

Scenedesmus intermedius (SiD1)

	% Patrón de Petróleo (V/V)					
	3%		9%		21%	
	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2
Nº de cultivos replicados	50	25	50	25	50	25
Nº de cultivos con 0 células resistentes	-	-	-	-	13	-
desde 1 a 10 ⁴	-	-	-	-	32	25
> 10 ⁴ cél. resistentes	50	25	50	25	5	-
Fluctuación	No		No		Sí	
Mecanismo de Adaptación	Adaptación fisiológica		Adaptación fisiológica		Mutación	
Tasa de mutación (μ)					1,3x 10 ⁻⁵	

	% Patrón de Diesel (V/V)					
	3%		9%		21%	
	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2
Nº de cultivos replicados	50	25	50	25	50	25
Nº de cultivos con 0 células resistentes	-	-	-	-	11	-
desde 1 a 10 ⁴	-	-	-	-	25	-
> 10 ⁴ cél. resistentes	50	25	50	25	14	-
Fluctuación	No		No		Sí	
Mecanismo de Adaptación	Adaptación fisiológica		Adaptación fisiológica		Mutación	
Tasa de mutación (μ)	-		-		1,5x 10 ⁻⁵	

Tabla 5: Resultados del análisis de fluctuación de *S. intermedius* en Patrón de petróleo y Diesel

Resultados de la selección y mejora de resistentes mediante ratchet:

La capacidad de adaptación al petróleo o al diesel de las tres especies estudiadas fue estimada en cultivos derivados, manteniendo grandes poblaciones, continuamente expuestas a altas concentraciones de los agentes selectivos durante el experimento de ratchet. (Tabla 6).

Se observaron diferencias considerables durante el tiempo o el número de generaciones requeridas para conseguir un crecimiento significativo de los cultivos, bajo exposición de los mismos, a concentraciones crecientes de estándares de petróleo o diesel en todas las especies ensayadas (Tabla 6).

La cianobacteria MaD3, procedente de aguas continentales, fue la que mostró menor capacidad de adaptación, comparada con el resto de las especies. Como se puede ver en la tabla 3, MaD3, es capaz de resistir concentraciones de estándares de petróleo o diesel de entre el 6 y 9% (v/v), pero no se observa crecimiento por encima de esas concentraciones. Según lo expuesto anteriormente podemos decir que la máxima concentración de petróleo o de diesel a la que se puede adaptar la cianobacteria mencionada es del 9% (v/v).

En contraste con estos resultados la clorofila de la especie *S. intermedius*, también procedente de aguas continentales, presenta, según los resultados la mayor capacidad de adaptación, a los contaminantes expuestos.

Se observó crecimiento en cultivos de SiD1 expuestos a concentraciones superiores al 11% (v/v) de estándares de petróleo y diesel (Tabla 6).

La microalga marina *D. tertiolecta* fue capaz de crecer a concentraciones de petróleo o diesel del 16% (v/v). El proceso de selección por ratchet progresó durante numerosas generaciones (alrededor de 310, 220 y 160 en SiD1, DtM1 y MaD3, respectivamente).

Además de estos resultados, los experimentos de ratchet nos proporcionan otros resultados importantes. Cada una de las réplicas de los cultivos ensayados constituye una población independiente. Por esta razón, los experimentos realizados nos permitieron analizar tres poblaciones independientes

Como regla general, las tres réplicas de la misma cepa evolucionan de manera similar. Aunque se observaron diferencias en el tiempo o en el número de generaciones a medida que se incrementaba la dosis de los agentes selectivos, durante el proceso de adaptación en el experimento de ratchet (Tabla 6) .

Esta variación entre réplicas de la misma especie en las mismas condiciones, nos revela la influencia del azar en el proceso de adaptación.

RESULTADOS

Ciclo Ratchet	Población	Dosis Ratchet	<i>Scenedesmus intermedius</i>		<i>Dunaliella tertiolecta</i>		<i>Microcystis aeruginosa</i>	
			Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel
1°	1	0,15 → 0,45	20	20	20	20	40	20
	2	0,45 → 1,5	40	40	40	40	40	80
	3	1,5 → 2,0	40	40	40	40	80	80
2°	1	0,45 → 1,5	40	20	40	40	40	40
	2	1,5 → 2,0	20	20	20	20	80	60
	3	2,0 → 3,0	20	20	20	40	80	80
3°	1	1,5 → 2,0	20	20	20	20	20	20
	2	2,0 → 3,0	20	20	40	20	80	60
	3	3,0 → 4,0	20	20	40	40	80	80
4°	1	2,0 → 3,0	20	20	40	20	80	80
	2	3,0 → 4,0	20	20	40	40	60	60
	3	4,0 → 6,0	40	20	60	40	80	80
5°	1	3,0 → 4,0	20	20	40	40	60	60
	2	4,0 → 6,0	40	20	60	40	80	60
	3	6,0 → 9,0	60	40	80	60	80	80
6°	1	4,0 → 6,0	40	20	60	40	60	60
	2	6,0 → 9,0	60	40	60	60	80	80
	3	9,0 → 12,0	60	40	80	60	incapaz	incapaz
7°	1	6,0 → 9,0	40	40	60	40	incapaz	incapaz
	2	9,0 → 12,0	60	40	80	60	incapaz	incapaz
	3	12,0 → 16,0	60	40	80	80		
8°	1	9,0 → 12,0	60	60	80	60	-	-
	2	12,0 → 16,0	60	60	80	80	-	-
	3	16,0 → 21,0	80	60	incapaz	incapaz	-	-
9°	1	12,0 → 16,0	80	60	80	80	-	-
	2	16,0 → 21,0	80	60	incapaz	incapaz	-	-
	3	21,0 → 30,0	80	80	-	-	-	-
10°	1	16,0 → 21,0	80	80	incapaz	incapaz	-	-
	2	21,0 → 30,0	incapaz	incapaz	-	-	-	-
11°	1	21,0 → 30,0	incapaz	incapaz	-	-	-	-

Tabla 6: resultados del crecimiento en los ciclos del experimento ratchet para las especies *Scenedesmus intermedius*, *Dunaliella tertiolecta* y *Microcystis aeruginosa*, con patrones de petróleo y diesel.

Resultados del Test de toxicidad final:

Se comparó, por último, la inhibición de la fotosistema II (ϕ PSII), y la tasa de crecimiento después de la exposición de los cultivos, a los estándares de petróleo y de diesel, entre los cultivos ancestrales (antes de los experimentos), y los mutantes resistentes obtenidos mediante análisis de fluctuación o selección mediante ratchet. (Tablas 1 y 4, respectivamente).

Mutantes resistentes obtenidos mediante análisis de fluctuación

Dosis (V/V)	Experimento de Fluctuación % Inhibición del ϕ PSII (media + desviación estándar)					
	Patrón de Petróleo			Patrón de Diesel		
	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	DtM1	MaD3
0% control	0	0	0	0	0	0
0.15%	1	2±1	6±3	1	2±1	6±3
0.45%	5±2	5±3	14±4	4±3	5±4	17±2
1.50%	7±1	9±6	29±11	7±2	8±3	28±7
3%	10±3	17±7	50±10	9±4	14±5	46±10
9%	15±4	23±10	98±9	13±6	21±7	98±10
12%	23±4	31±11	-	21±7	32±6	-
16%	35±6	42±9	-	33±10	44±5	-
21%	73±7	97±8	-	69±9	91±11	-
30%	91±11	-	-	90±10	-	-

Tabla 7: Test de toxicidad final: efectos en el incremento de dosis de patrones de petróleo y diesel en la fotosíntesis (actividad de ϕ PSII) después del análisis de fluctuación.

Los mutantes resistentes obtenidos mediante análisis de fluctuación muestran un incremento significativo en la resistencia a los estándares mencionados. Por ejemplo, en el caso de la especie salvaje de SiD1, una concentración del 12% de petróleo o diesel inhibe el crecimiento, pero los mutantes resistentes obtenidos mediante análisis de fluctuación son capaces de crecer a concentraciones del 21% de los agentes selectivos.

RESULTADOS

En el caso de la especie salvaje de MaD3, el crecimiento se inhibe para concentraciones del 3% de petróleo o diesel, pero es necesaria una concentración del 9%, para inhibir el crecimiento en los mutantes obtenidos mediante análisis de fluctuación.

Dosis (V/V)	Experimento de Fluctuación Tasa de Crecimiento (r) (media + desviación estándar)					
	Patrón de Petróleo			Patrón de Diesel		
	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	DtM1	MaD3
0% control	0.74±0.05	0.61±0.03	0.53±0.05	0.74±0.05	0.61±0.03	0.53±0.05
0.15%	0.74±0.06	0.60±0.04	0.52±0.05	0.75±0.03	0.57±0.06	0.51±0.05
0.45%	0.71±0.06	0.55±0.03	0.29±0.08	0.70±0.03	0.55±0.05	0.32±0.03
1.50%	0.57±0.11	0.51±0.07	0.20±0.07	0.56±0.07	0.53±0.10	0.17±0.07
3%	0.46±0.09	0.34±0.03	0.05±0.03	0.49±0.12	0.36±0.09	0.05±0.04°
9%	0.34±0.11	0.17±0.08	No hay crecimiento	0.36±0.07	0.21±0.08	No hay crecimiento
12%	0.24±0.13	0.09±0.06	-	0.26±0.02	0.11±0.07	-
16%	0.09±0.07	0.07±0.05	-	0.11±0.05	0.06±0.04	-
21%	0.03±0.02	No hay crecimiento	-	0.05±0.03	No hay crecimiento	-
30%	No hay crecimiento	-	-	No hay crecimiento	-	-

Tabla 8: tasa de crecimiento (r), de las cepas de *Scenedesmus intermedius* (SiD1), *Dunaliella tertiolecta* (DtM1) and *Microcystis aeruginosa* (MaD3) posteriores al experimento de fluctuación. Dosis expresadas en v/v (petróleo o diesel / medio de cultivo).

RESULTADOS

Resultados de las cepas resistentes obtenidas mediante selección por Ratchet

Dosis (V/V)	Experimento de Ratchet % Inhibición del ϕ PSII (media + desviación estándar)					
	Patrón de Petróleo			Patrón de Diesel		
	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	DtM1	MaD3
0% control	0	0	0	0	0	0
0.15%	0	0	1	0	0	0
0.45%	1	2±1	3±1	0	1	2
1.50%	3±1	5±2	8±3	3±1	3±1	7±2
3%	4±1	14±4	21±6	4±1	10±1	19±2
9%	5±4	21±5	35±3	5±3	18±4	32±7
12%	10±3	28±6	100%	9±2	29±4	100%
16%	20±2	49±7	-	19±3	48±9	-
21%	25±5	97±11	-	23±2	96±7	-
30%	33±7	-	-	31±4	-	-
50%	39±9	-	-	37±6	-	-

Tabla 9: Test de toxicidad final: efectos en el incremento de dosis de patrones de petróleo y diesel en la fotosíntesis (actividad de ϕ PSII) después del experimento de ratchet.

Además, todos los cultivos resistentes derivados de las especies estudiadas (MaD3, DtM1 y SiD1) presentan un incremento significativo en sus tasas de adaptación a los agentes selectivos después de varios ciclos del experimento de ratchet, comparados con los mutantes obtenidos mediante análisis de fluctuación. La concentración máxima a la que son capaces de adaptarse los mutantes seleccionados mediante ratchet, es decir, la que permite el crecimiento, nos indica una estimación de la máxima capacidad de adaptación antes mencionada en los cultivos de las especies estudiadas.

RESULTADOS

Dosis (V/V)	Experimento de Ratchet Tasa de Crecimiento (r) (media + desviación estándar)					
	Patrón de Petróleo			Patrón de Diesel		
	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	DtM1	MaD3
0% control	0.74±0.05	0.61±0.03	0.53±0.05	0.74±0.05	0.61±0.03	0.53±0.05
0.15%	0.74±0.06	0.60±0.03	0.50±0.02	0.72±0.01	0.61±0.04	0.51±0.03
0.45%	0.72±0.02	0.53±0.01	0.38±0.06	0.72±0.02	0.55±0.04	0.41±0.04
1.50%	0.71±0.04	0.47±0.06	0.26±0.08	0.73±0.04	0.49±0.05	0.30±0.01
3%	0.70±0.06	0.38±0.05	0.24±0.07	0.71±0.03	0.41±0.03	0.23±0.05
9%	0.68±0.05	0.28±0.05	0.15±0.09	0.69±0.06	0.33±0.07	0.16±0.06
12%	0.61±0.02	0.23±0.08	No hay crecimiento	0.65±0.07	0.26±0.03	No hay crecimiento
16%	0.48±0.03	0.12±0.03	-	0.51±0.04	0.14 ±0.05	-
21%	0.42±0.06	No hay crecimiento	-	0.45±0.04	No hay crecimiento	-
30%	0.38±0.06	-	-	0.39±0.03	-	-
50%	0.34±0.05	-	-	0.35±0.03	-	-

Tabla 10: tasa de crecimiento (r), de las cepas de *Scenedesmus intermedius* (SiD1), *Dunaliella tertiolecta* (DtM1) and *Microcystis aeruginosa* (MaD3) posteriores al experimento de ratchet. Dosis expresadas en v/v (petróleo o diesel /medio de cultivo).

6.2. Resultados de la respuesta de la eficacia biológica (fitness malthusiano) a la selección durante el experimento de Ratchet.

La respuesta del parámetro malthusiano de fitness (eficacia biológica) a la selección que se produjo durante el experimento de Ratchet para incrementar la resistencia al petróleo y al diesel, varió considerablemente entre las distintas dosis:

La respuesta a la selección fue muy baja (prácticamente cero), a la dosis más pequeña estudiada (0.15% de petróleo o de diesel, Tabla 11). También la heredabilidad tomó valores muy bajos. Esto indica que durante los centenares de generaciones que duró el experimento de Ratchet, prácticamente no se fijó en la población ningún nuevo genotipo originado por mutación. Aunque la mutación ocurre a una tasa constante y tanto el tamaño de las poblaciones como el número de generaciones transcurrido asegura la ocurrencia de innumerables mutaciones nuevas, estas no se fijan en las poblaciones, principalmente porque el efecto tóxico de estas bajas dosis de petróleo y de diesel es lo suficientemente bajo como para que una simple adaptación fisiológica de los genotipos originales pueda resistirla.

A medida que aumentan las dosis de petróleo y de diesel, progresivamente aumenta la respuesta a la selección, así como los valores de heredabilidad en las distintas especies. También se observa que las microalgas en general y *Scenedesmus* en particular se adaptan mucho mas fácilmente (por aclimatación fisiológica) que la cianobacteria *Microcystis*.

Así a dosis de 0.45% de petróleo o de diesel (Tabla 12), la respuesta a la selección y la heredabilidad realizada sigue siendo muy baja en *Scenedesmus* y *Dunaliella* (prácticamente 0, indicando que la adaptación todavía se debe a componentes no genéticos), mientras que en *Microcystis* ya se produce una considerable respuesta a la selección (alrededor del 0.22) mientras que los valores de heredabilidad son ya de aproximadamente 0.56, indicando que en esta especie los componentes genéticos ya resultan imprescindibles para lograr la adaptación.

A dosis de 1.5% y de 3% de petróleo y diesel (Tablas 13 y 14), en todas las especies se observa una elevada respuesta a la selección y valores de heredabilidad altos indicando que los componentes genéticos resultan ya imprescindibles para conseguir la adaptación a estas dosis elevadas de petróleo y diesel. La dosis del 3% marca ya el límite en *Microcystis*, donde el valor de heredabilidad es 1, indicando que toda la adaptación se produce debido solo a la base genética.

Esta tendencia prosigue con las dosis mayores de 9% y 12% de petróleo y diesel. El 9% marca ya el límite para *Dunaliella*, cuya heredabilidad alcanza un valor de 1, indicando que toda la adaptación se produce debido solo a los componentes genéticos. Por último la dosis del 12% de petróleo o diesel marca el límite para *Scenedesmus* (heredabilidad de 1; se adapta exclusivamente en base a componentes genéticos). Esta dosis también marca el límite de adaptación para *Microcystis*, que ya no consigue adaptarse (Tablas 15 y 16).

Hay que destacar que tanto la respuesta de todas las especies a todas las dosis fue muy semejante con independencia de que el tóxico fuese petróleo o gasoil.

RESULTADOS

	DOSIS 0.15%					
	SiD1		DtM1		MaD3	
	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel
Valor fenotípico después de la selección	0,74	0,72	0,6	0,61	0,5	0,51
Valor fenotípico antes de la selección	0,73	0,72	0,61	0,6	0,42	0,45
Respuesta a la selección	0,01	0	-0,01	0,01	0,08	0,06
Heredabilidad realizada estimada	0,014	-	-	0,016	0,160	0,118

Tabla 11: parámetros de respuesta a la selección y heredabilidad para dosis de patrones de petróleo y diesel del 0.15%, de las cepas de *Scenedesmus intermedius* (SiD1), *Dunaliella tertiolecta* (DtM1) and *Microcystis aeruginosa* (MaD3)

	DOSIS 0.45%					
	SiD1		DtM1		MaD3	
	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel
Valor fenotípico después de la selección	0,72	0,72	0,53	0,55	0,38	0,41
Valor fenotípico antes de la selección	0,68	0,69	0,53	0,56	0,16	0,18
Respuesta a la selección	0,04	0,03	0	-0,01	0,22	0,23
Heredabilidad realizada estimada	0,056	0,042	-	-	0,579	0,561

Tabla 12: parámetros de respuesta a la selección y heredabilidad para dosis de patrones de petróleo y diesel del 0.45%, de las cepas de *Scenedesmus intermedius* (SiD1), *Dunaliella tertiolecta* (DtM1) and *Microcystis aeruginosa* (MaD3)

RESULTADOS

	DOSIS 1.5%					
	SiD1		DtM1		MaD3	
	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel
Valor fenotípico después de la selección	0,71	0,73	0,47	0,49	0,26	0,3
Valor fenotípico antes de la selección	0,36	0,45	0,29	0,31	0,09	0,07
Respuesta a la selección	0,35	0,28	0,18	0,18	0,17	0,23
Heredabilidad realizada estimada	0,493	0,384	0,383	0,367	0,654	0,767

Tabla 13: parámetros de respuesta a la selección y heredabilidad para dosis de patrones de petróleo y diesel del 1.5%, de las cepas de *Scenedesmus intermedius* (SiD1), *Dunaliella tertiolecta* (DtM1) and *Microcystis aeruginosa* (MaD3)

	DOSIS 3%					
	SiD1		DtM1		MaD3	
	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel
Valor fenotípico después de la selección	0,7	0,71	0,38	0,41	0,24	0,23
Valor fenotípico antes de la selección	0,31	0,37	0,26	0,28	0	0
Respuesta a la selección	0,39	0,34	0,12	0,13	0,24	0,23
Heredabilidad realizada estimada	0,557	0,479	0,316	0,317	1,000	1,000

Tabla 14: parámetros de respuesta a la selección y heredabilidad para dosis de patrones de petróleo y diesel del 3%, de las cepas de *Scenedesmus intermedius* (SiD1), *Dunaliella tertiolecta* (DtM1) and *Microcystis aeruginosa* (MaD3)

RESULTADOS

	DOSIS 9%					
	SiD1		DtM1		MaD3	
	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel
Valor fenotípico después de la selección	0,68	0,69	0,28	0,33	0,15	0,16
Valor fenotípico antes de la selección	0,04	0,11	0	0	0	0
Respuesta a la selección	0,64	0,58	0,28	0,33	0,15	0,16
Heredabilidad realizada estimada	0,941	0,841	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabla 15: parámetros de respuesta a la selección y heredabilidad para dosis de patrones de petróleo y diesel del 9%, de las cepas de *Scenedesmus intermedius* (SiD1), *Dunaliella tertiolecta* (DtM1) and *Microcystis aeruginosa* (MaD3)

	DOSIS 12%					
	SiD1		DtM1		MaD3	
	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel	Patrón de Petróleo	Patrón de Diesel
Valor fenotípico después de la selección	0,61	0,65	0,23	0,26	0	0
Valor fenotípico antes de la selección	0	0	0	0	0	0
Respuesta a la selección	0,61	0,65	0,23	0,26	0	0
Heredabilidad realizada estimada	1	1	1	1		

Tabla 16: parámetros de respuesta a la selección y heredabilidad para dosis de patrones de petróleo y diesel del 12%, de las cepas de *Scenedesmus intermedius* (SiD1), *Dunaliella tertiolecta* (DtM1) and *Microcystis aeruginosa* (MaD3)

6.3. Aplicaciones de la adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos: biorremediación de petróleo en ecosistemas acuáticos.

Los resultados de los experimentos, que se resumen en la figura 9, muestran como en condiciones totalmente aisladas de otra fuente de carbono no perteneciente al petróleo inoculado, las especies consideradas proliferan satisfactoriamente degradando el petróleo.

De los resultados obtenidos podemos decir que la especie *Scenedesmus rapaporti* presenta una tasa de degradación más alta que la especie *Scenedesmus obtusus*.

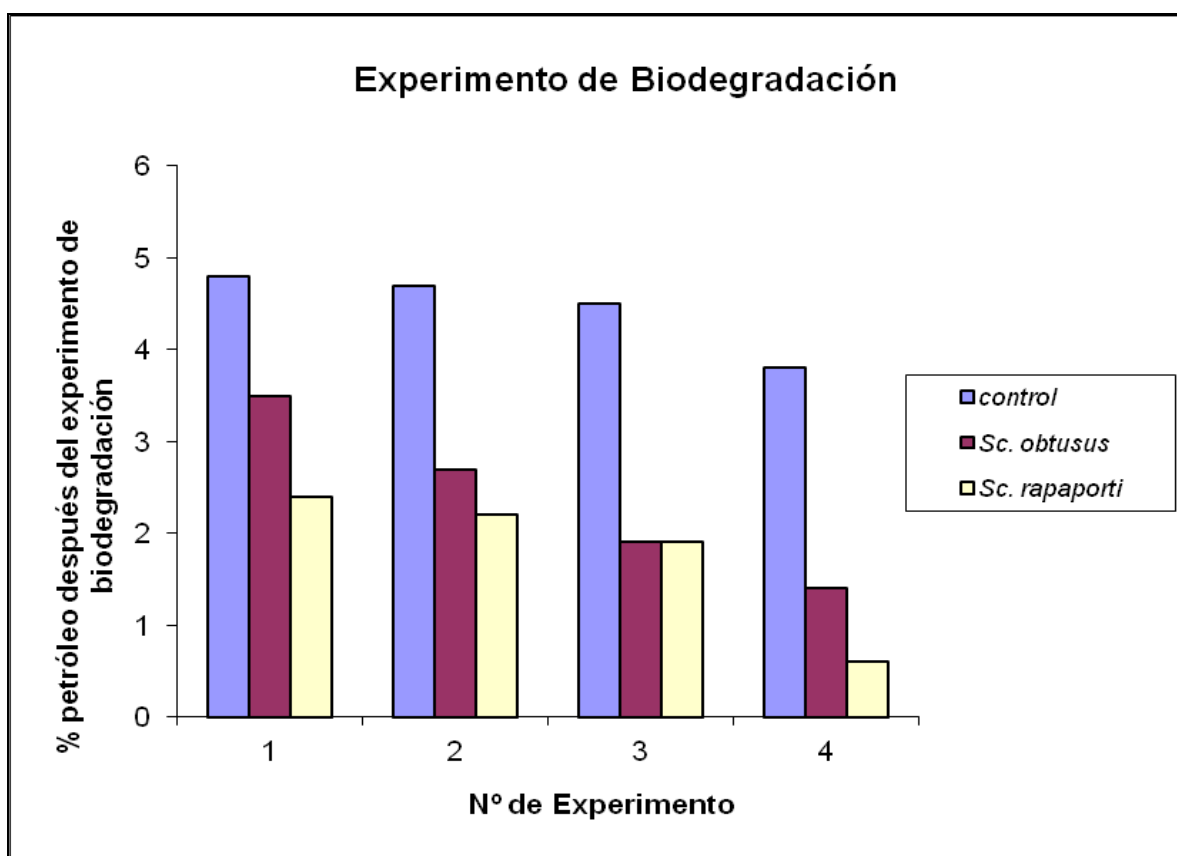


Fig 9: Biodegradación de Hidrocarburos con *Sc.obtusus* y *Sc.rapaporti*.

Resultados del Análisis estadístico: Comprobación de la existencia de biodegradación

De los datos representados en la figura 9 se realiza un Test H de Kruskal-Wallis, para comprobar que existe biodegradación o biorremediación del agente tóxico inoculado en los experimentos realizados. Los resultados obtenidos aparecen en la siguiente tabla:

Comparación de datos procedentes de Controles vs *Sc.obtusius* y *Sc.rapaporti*

Media de Rangos			
Control	10,5	KW=7,6	p=0,2*
Sc.rapaporti	3,8		
Sc. obtusius	5,1		

Tabla 17: Análisis de datos mediante el test H de Kruskal-Wallis

* : existen diferencias significativas entre las poblaciones comparadas.

KW: parámetro de Kruskal Wallis.

El test H de Kruskal-Wallis indica que una vez calculados los rangos de los resultados obtenidos en los experimentos y el parámetro de Kruskal-Wallis (KW), si la probabilidad obtenida es menor o igual de 0,05 entonces se demuestra que hay diferencias significativas entre todos los resultados de biodegradación obtenidos en los experimentos realizados.

Lo que constata que ha existido biodegradación de los hidrocarburos presentes en el petróleo inoculado.

Cálculo de las tasas de biodegradación de Hidrocarburos

De los datos representados en la figura 9 se realiza un análisis estadístico convencional, cuyos resultados aparecen en la siguiente tabla:

Especie	Nº Puntos	Media	s	Error std. en μ	Mediana
Control	4	4,450	0,4509	0,2255	4,600
<i>S. rapaporti</i>	4	1,175	0,8098	0,4049	2,050
<i>S. obtusus</i>	4	2,375	0,9215	0,4608	2,300

Tabla 18: Datos de la biodegradación de hidrocarburos con *S.obtus* y *S.rapaporti*

Tasa de degradación de *Scenedesmus obtusus*: 49 %.

Tasa de degradación de *Scenedesmus rapaporti*: 74 %.

Cálculo de las diferencias entre las tasas de biodegradación de Hidrocarburos

De los datos representados en la figura 8 se realiza un test de Dunn, cuyos resultados aparecen en la siguiente tabla:

Diferentes rangos		
Control vs <i>S.rapaporti</i>	6,6	$p < 0,05^*$
Control vs <i>S. obtusus</i>	5,4	$p < 0,05^*$
<i>S.rapaporti</i> vs <i>S. obtusus</i>	1,2	$p > 0,05$

Tabla 19: Test de comparación múltiple de Dunn

* : existen diferencias significativas entre las poblaciones comparadas

El test H de Dunn indica que una vez calculados los rangos de los resultados obtenidos en los experimentos y aplicando el estadístico de Dunn, si la probabilidad obtenida (p), es menor o igual de 0,05 entonces se demuestra que hay diferencias significativas entre los experimentos realizados entre los controles y cada una de las especies, sin embargo no existen diferencias significativas entre los ensayos realizados entre ambas especies.

El Bootstrap resampling consiste en generar, con los datos obtenidos en los experimentos, una serie aleatoria de datos de los mismos valores. Esto equivaldría a haber hecho un número de experimentos mucho mayor, lo que permite evaluar realmente la diferencia entre las tasas de biodegradación de *Scenedesmus rapaporti* y *Scenedesmus obtusus*.

<i>S.rapaporti</i> vs <i>S. obtusus</i>	p<0,05*
---	---------

Tabla 20: Bootstrap resampling (generación de 10^5 datos)

* : existen diferencias significativas entre las poblaciones comparadas.

A pesar de que el test de Dunn no indica diferencias significativas entre las tasas de biodegradación de las especies estudiadas, porque el número de experimentos realizados es pequeño, al aplicar un Bootstrap resampling aparecen diferencias significativas entre las tasas de degradación de las especies estudiadas.

7. DISCUSIÓN

"Si los resultados no se ajustan a la teoría, peor para la teoría "

" Carlos Castillo del Pino, Naturaleza del saber "

7.1. Mecanismos de adaptación y mejora de microalgas a contaminantes antropogénicos

Existen muchas evidencias de que el petróleo es tóxico para las microalgas, a pesar de que algunas especies son más resistentes que otras (Siron et al., 1996; Tewari et al., 2001; Suderman & Thistle, 2004; Varela et al., 2006; Salas et al., 2006). En consecuencia, la exposición a petróleo o a diesel, inhibe el 100% del crecimiento en todas las especies analizadas antes de los experimentos de selección y mejora realizados.

A pesar de esto, hasta el momento se conoce poco sobre los mecanismos de adaptación del fitoplancton a estos contaminantes antropogénicos, y sus causas.

Comprender los mecanismos implicados en la adaptación de microalgas expuestas a petróleo o derivados, sería seguramente muy útil para la realización de predicciones sobre la evolución de la ecología del fitoplancton expuesto a contaminación derivada de crudo de petróleo.

Los vertidos de crudo de petróleo reducen drásticamente la riqueza de especies del fitoplancton, dado que la supervivencia de las microalgas sometidas a una contaminación extrema con petróleo sólo podría lograrse mediante algún tipo de adaptación (Lopez-Rodas et al., 2009; Carrera-Martinez et al., 2010, 2011).

Generalmente se asume que los organismos fitoplanctónicos pueden sobrevivir a contaminantes como resultado de aclimatación fisiológica apoyados por modificaciones de la expresión génica.

Sin embargo, cuando la concentración de un factor tóxico excede los límites fisiológicos, la supervivencia se basa en la evolución adaptativa, que depende, en última instancia, del origen de nuevas mutaciones (Sniegowski and Lenski, 1995; Sniegowski, 2005).

En los experimentos realizados en este trabajo de investigación, cuando las diferentes cepas fueron expuestas a patrón de petróleo o diesel, se pudo ver que los cultivos mostraron una destrucción masiva de las células sensibles.

Después de la incubación posterior con crudo de petróleo o diesel, algunos cultivos fueron capaces de crecer debido a las células que eran resistentes a los agentes tóxicos. Estas células resistentes son la clave para la comprensión de la adaptación del fitoplancton a la contaminación de los patrones de petróleo o diesel.

El análisis de fluctuación permite distinguir entre las células resistentes, derivadas de raras mutaciones espontáneas que ocurren al azar, durante la replicación de los organismos antes de la exposición al petróleo, y células resistentes que adquirieron adaptación inducida por la exposición al petróleo o aclimatación, motivadas por las modificaciones de la expresión génica.

Las grandes fluctuaciones en el número de células resistentes a los patrones de petróleo o diesel observadas en los experimentos del Set 1, en comparación con la fluctuación insignificante en los controles del Set 2 (observado en las concentraciones de 3%, 9% y 21% (v/v) de patrones de petróleo o diesel en agua para Ma3D, DtM1 y SiD1, respectivamente), sugiere que estas células resistentes surgieron por raras mutaciones espontáneas y no a través de la adaptación directa y específica en respuesta a los patrones de petróleo o diesel.

Los agentes selectivos no estimularon la aparición de las células resistentes y en presencia del rápido efecto letal de hidrocarburos procedentes del petróleo y del diesel parece improbable la aparición de mutaciones adaptativas.

En contraste cuando los cultivos se exponen a bajas concentraciones de los agentes selectivos, no se observa fluctuación, demostrando así, que es toxicidad no excede los límites de la adaptación fisiológica.

Como la adaptación a condiciones extremas, tales como vertidos de petróleo o diesel, es difícil, el punto de vista clásico, se asume que la adaptación genética bajo condiciones tan extremas es un proceso gradual (revisado por Gould, 2002).

Por el contrario, según los resultados obtenidos en los experimentos realizados podemos decir, que algunas cianobacterias y microalgas pueden adaptarse al petróleo o al diesel, extremadamente rápido a través de mutaciones individuales.

Evidencias recientes sugieren que la mutación en un locus permite la adaptación de cianobacterias y microalgas a otros ambientes hostiles (Flores-Moya et al., 2005; Costas et al., 2007; Lopez-Rodas et al., 2008a,b) así como a otros contaminantes antropogénicos (Costas et al., 2001; Lopez-Rodas et al., 2001, 2006; Garcia-Villada et al., 2002, 2004).

Las tasas de mutación de células sensibles al petróleo o al diesel, frente a células resistentes van desde 1.2×10^{-5} to 1.8×10^{-5} mutantes por división celular. Estos valores se encuentran entre los más altos en microalgas. Se observaron efectos similares en crudo de petróleo (Carrera-Martinez et al., 2010, 2011).

Por lo general, las tasas de mutación de microalgas sensibles frente a resistentes a los agentes contaminantes, oscilan entre 10^{-5} y 10^{-7} , sugiriendo que el cambio genético necesario para convertirse en células resistentes al petróleo o al diesel se logra más fácilmente, que adaptarse a otros tipos de contaminantes, en microalgas.

En cualquier caso, parece ser que la adaptación a altas concentraciones de petróleo o diesel es complicada. Ni *M. aeruginosa* ni *D. tertiolecta* fueron capaces de adaptarse rápidamente a 9% o 21% (v/v) medios con petróleo o diesel, respectivamente, en los experimentos de fluctuación.

Sin embargo, es posible estimar la máxima capacidad de adaptación de microalgas a un agente selectivo a través de modelos experimentales manteniendo grandes poblaciones de células en constante división bajo altas presiones de selección. Esta limitación puede superarse mediante la realización de experimentos que incluyen varios valores de presión de selección (Huertas et al., 2010, 2011).

Este enfoque asegura tanto la aparición de mutaciones que confieren adaptación como el mantenimiento simultáneo de una fuerte presión de selección, que aseguran su conservación dentro de la población. Estas aproximaciones metodológicas se denominan ensayos de ratchet. La selección por ratchet incrementa significativamente la resistencia al petróleo (por ejemplo hasta seis veces en *M. aeruginosa*).

El procedimiento de ratchet estima la máxima capacidad de adaptación de microorganismos a un agente selectivo como resultado de dos procesos: aclimatación fisiológica apoyado por modificaciones de la expresión génica, y adaptación genética, que ocurre debido a la aparición de mutaciones que confieren resistencia y posterior selección.

Sin embargo, la resistencia máxima debe lograrse mediante la adaptación genética. Carrera-Martinez et al. (2010, 2011), demostraron que las microalgas eran capaces de proliferar en bajas concentraciones de petróleo como resultado de la aclimatación fisiológica, pero la adaptación de esas microalgas a altas concentraciones de petróleo dependía exclusivamente de nuevas mutaciones que les conferían resistencia.

Después de 10 ciclos de ratchet, *S. intermedius*, es capaz de crecer en medios que contienen incluso concentraciones del 21% de petróleo o diesel. De la misma manera, *D. tertiolecta*, es capaz de crecer, después de 9 ciclos de ratchet, en medios con concentraciones del 16% de petróleo o diesel.

Por el contrario, las cianobacterias no demostraron una fuerte capacidad de adaptación. Varios estudios sobre adaptación han demostrado que las chlorophytas son generalmente las más capaces de adaptarse rápidamente a ambiente extremos en comparación con las cianobacterias y otras microalgas eucariotas.

Este patrón se observó por primera vez tras el vertido tóxico de metales pesados en la mina de Aznalcóllar en España (Baos et al., 2002) y fue confirmado en otros ambientes contaminado con metales pesados tanto en España (Lopez-Rodas et al., 2008a), como en otros países (Lopez-Rodas et al., 2008b, Costas et al., 2007).

En el municipio de Casares en España, unas pocas especies de chlorophytas mesófilas proliferan como un ejemplo de rápida adaptación a aguas contaminadas con una gran cantidad de azufre (Flores-Moya et al., 2005). Esta situación también parece ser el patrón seguido por las microalgas en aguas geotérmicas extremadamente contaminadas de Italia y Argentina (Costas et al., 2008; Lopez-Rodas et al., 2009).

Aunque todavía quedan muchas incógnitas sobre el impacto que tiene en el fitoplancton la contaminación de petróleo y derivados, este estudio demuestra, que es posible obtener una idea de la respuesta de las poblaciones de microalgas a los cambios en las condiciones del hábitat, mediante el diseño de experimentos que permitan evaluar la capacidad de adaptación genética de estos microorganismos.

Usando un argumento de tipo "lex parsimoniae", los resultados de este trabajo sugieren que la supervivencia del fitoplancton en medios contaminados con petróleo y derivados, implica una combinación compleja de aclimatación fisiológica, mutación y selección.

En primer lugar, las microalgas pueden sobrevivir en ambientes desfavorables como resultado de la aclimatación fisiológica, que se produce por las modificaciones fenotípicas sin cambios genéticos. Sin embargo, cuando el umbral de un factor ambiental supera los límites fisiológicos, la supervivencia depende exclusivamente de la adaptación genética, apoyado por la aparición de mutaciones que confieren resistencia y posterior selección de estos mutantes. Una mutación única, rara, espontánea, pre-selectiva es capaz de asegurar la supervivencia de las microalgas bajo contaminación al petróleo o al diesel.

La tasa de mutación de la sensibilidad frente a la resistencia contra petróleo o diesel es capaz de asegurar la supervivencia de especies de microalgas en un ambiente contaminado con hidrocarburos. En conclusión, es cierto que las mutaciones y la selección determinarán en última instancia, la adaptación de estos microorganismos.

7.2. Respuesta de la eficacia biológica (fitness malthusiano) a la selección durante el experimento de Ratchet.

Desde un enfoque de genética evolutiva, la aportación conceptual mas novedosa de este trabajo consiste en interpretar la respuesta de la eficacia biológica (fitness malthusiano) a la selección que se produce durante el experimento de Ratchet para incrementar la resistencia al petróleo. Lógicamente decidimos trabajar con un parámetro como la fitness, porque es el parámetro más importante desde un punto de vista evolutivo.

Desde los inicios de la genética de poblaciones, la posibilidad de obtener una predicción de la capacidad de adaptación de un organismo frente al cambio ambiental resultó ser un objetivo prioritario. En 1930, Sir Ronald Fisher acuñó el Teorema General de la Selección Natural, posiblemente el más importante principio de la biología de poblaciones, "*the rate of increase in fitness of any organism at any time is equal to its genetic variance in fitness at that time*". Este principio se aplicó principalmente a poblaciones mendelianas de organismos diploides, considerando que la variabilidad genética ya existente dentro de las poblaciones era la mayor fuente de variabilidad (prácticamente la única). Así los mecanismos de mantenimiento de la variabilidad genética en las poblaciones (revisados por Fontdevila et al. 1975, Lewontin, 1974) cobraron una importancia prioritaria en la biología evolutiva.

Pero estos estudios expresamente desarrollados para poblaciones de organismos diploides con reproducción sexual no pueden aplicarse a organismos que son generalmente haploides y con claro predominio de la reproducción asexual, entre los que se encuentran organismos tan importantes como los organismos fitoplanctónicos los cuales son responsables de la mitad de la producción primaria de la Tierra. (Falkowsky & Raven, 1997).

En estos organismos se ha seguido otro enfoque diferente: se trata de organismos unicelulares microscópicos, con tiempos de generación muy cortos (≈ 24 horas), que pueden cultivarse en el laboratorio en cantidades ingentes (hasta 60 millones de células ml^{-1}), en los que pueden abordarse experimentos implicando centenares de generaciones y muchos millones de individuos en poco tiempo. Así se ha optado por abordajes experimentales que permitan averiguar el papel de la aparición de nuevas mutaciones en la evolución (Costas et al., 2008; García-Balboa et al. 2013, Marvá et al. 2010, Lopez-Rodas et al. 2009) y elucidar las causas de la adaptación al cambio (Flores-Moya et al. 2012, 2008; Rouco et al. 2011). Recientemente también se ha intentado predecir el potencial evolutivo de poblaciones de estos organismos fitoplanctónicos mediante el cálculo de la heredabilidad (López-Rodas et al. 2014, in press).

Un importante paso se dio cuando se desarrollaron los experimentos de ratchet, que permitieron determinar experimentalmente los límites máximos de la adaptación (medir la máxima capacidad de adaptación) (Orellana et al., 2008; Reboud et al., 2007; Huertas et al., 2010; 2011; Romero-López et al., 2012) lo que representó un avance conceptual fundamental. Sin embargo estos experimentos adolecían de una importante limitación conceptual: aunque podía determinarse experimentalmente la máxima capacidad de adaptación, no podía saberse cuanto de ésta se debía a los componentes genéticos y cuanto se debía a los componentes residuales no genéticos (a la adaptación fisiológica).

En este trabajo se ha realizado un experimento de ratchet para medir experimentalmente la máxima capacidad de adaptación al petróleo y al diesel. En el que la aclimatación fisiológica juega un papel importante sobre todo a bajas dosis. Pero sin duda alguna la aparición de nueva variabilidad genética por mutación sobre la que posteriormente actúa la selección es el factor más importante a tener en cuenta.

Aunque se pueda medir experimentalmente la máxima capacidad de adaptación, hasta la fecha nadie ha sido capaz de medir cuanto de esta adaptación se debía a causas genéticas (en concreto a la aparición de nuevas mutaciones que confieren resistencia sobre las que actúa la selección natural) y cuanto se debe a causas no genéticas.

Nuestros resultados describen por primera vez un procedimiento que permite determinar cuanto es genético y no genético en la capacidad de adaptación a distintas dosis crecientes de petróleo y diesel. Partimos de una población inicial sin variabilidad genética (una sola célula que empieza a reproducirse asexualmente) en la que por tanto aun no actúa la selección, en la cuál, a lo largo de las generaciones aparecen mutantes, para acabar con una población final con cierto grado de variabilidad genética, resultado de la acción de las fuerzas evolutivas (principalmente la mutación originando nuevos genotipos y la selección natural cambiando sus frecuencias).

Como cabría esperar, la respuesta de la eficacia biológica a la selección que se produjo durante el experimento de ratchet para incrementar la resistencia al petróleo y al diesel, y que estimamos mediante el parámetro malthusiano de fitness (tasa de crecimiento), varió considerablemente entre las distintas dosis y entre las diferentes especies.

Lógicamente a las especies les resultó mas fácil adaptarse a bajas dosis de petróleo y diesel que a altas. En general puede conseguirse adaptación a bajas dosis en parte debido a aclimatación fisiológica y en parte debido a la aparición de nuevos mutantes que confieren resistencia. Este fenómeno ya había quedado establecido en anteriores trabajos empleando análisis de fluctuación, pero es la primera vez que se establece en experimentos de ratchet que afectan a un gran número de generaciones.

A medida que se incrementaron las dosis la heredabilidad aumentó. Cuando se alcanzaron las dosis más altas, solo la nueva variabilidad genética aparecida por mutación durante los centenares de generaciones a lo largo del tiempo, que duró el experimento, permitió su adaptación.

Aunque tradicionalmente la heredabilidad suele interpretarse en el sentido de una partición de varianza (fracción de la variabilidad fenotípica debida a componentes genéticos), en último término podemos interpretar la heredabilidad como la capacidad de responder a la selección.

Así nuestra estima de la heredabilidad realizada al final de un experimento de ratchet nos permite estimar cual es la máxima capacidad genética de respuesta a la selección en poblaciones de organismos fitoplanctónicos, en los que a lo largo de las generaciones va apareciendo nueva variabilidad genética por mutación.

7.3. La adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos específicos: petróleo

Los ambientes extremófilos, caracterizados por los valores extremos de pH, materiales tóxicos, altas o bajas temperaturas y otros factores, promueven la adaptación de muchos microorganismos a condiciones inusuales.

La proliferación de estos microorganismos en ambientes extremos está motivada por la selección natural, que se produce por mutación espontánea, es decir, al azar y sin influencia del agente selectivo, después de generaciones y generaciones de adaptación, propiciadas por ciclos de vida cortos y la alta variabilidad genética presente en los mismos.

La mayoría de las especies degradadoras de crudo de petróleo descritas actualmente han sido encontradas en las proximidades de vertidos, tanto naturales como artificiales, como resultado de las adaptaciones producidas por mutaciones al azar (preadaptativas) que han realizado especies comunes a las condiciones adversas del entorno a las que se ven sometidas (Eshafie et al. 2007; Yang et al. 2009; Dasa et al. 2007; Mackew et al 2007; Zinjarde & Pant 2002). En la mayoría de los casos se trata de especies bacterianas, pero en este trabajo se describen también varias especies de microalgas.

Se ha podido encontrar una variedad muy amplia de biomasa algal incluso en las zonas más contaminadas de Arroyo Minero, Argentina.

Las microalgas han sido capaces de crecer en contacto con la contaminación por vertidos de crudo recalcitrantes. Gracias a su adaptación en las adversas condiciones de crecimiento a las que se han visto sometidas, unas pocas especies de zooplancton y micro invertebrados, han podido también sobrevivir en el ecosistema de Arroyo Minero constituyendo una cadena trófica.

Al parecer, la adaptación a la contaminación de los vertidos de crudo de petróleo no es fácil, y la mayoría de las especies de microalgas son capaces de realizar satisfactoriamente esta adaptación después de un proceso de evolución que incluye procesos de mutación espontánea.

Después de los experimentos realizados, los resultados parecen indicar que las especies de microalgas ensayadas, *Scenedesmus obtusus* y *Scenedesmus rapaporti* se encuentran perfectamente adaptadas al ambiente extremo de Río Negro, en el que las principales fuentes de carbono resultan ser crudo de petróleo, en el caso de Arroyo Minero, o petróleo, en el caso de los experimentos realizados.

Comparación de Métodos físicos y químicos vs Métodos biológicos

En general, los métodos físicos de eliminación de hidrocarburos aplicados a los vertidos de crudo de petróleo o la eliminación del mismo crudo en sí, resultan complejos de utilizar, debido a las extensiones de los vertidos y a la capacidad de respuesta de remediación de los mismos (Trejo-Hernández et al. 2007; Hughey et al. 2007; Nikolopouou & Kalogerakis 2008; Chaîneau et al. 2005). Estos métodos, además de ser eficaces sólo en las primeras etapas después de haberse producido el vertido, son generalmente problemáticos porque los residuos recogidos son tóxicos y el almacenamiento de los mismos es complicado.

Los métodos químicos del mismo modo, presentan serios problemas. Los dispersantes empleados pueden ser una alternativa eficaz, pero son agentes muy selectivos, en los que la capacidad de actuación, es decir, la reacción química producida, requiere unas condiciones de temperatura y cinética específicas para proporcionar los rendimientos esperados.

Aún en los mejores casos, los hidrocarburos y el mismo crudo de petróleo, no se degradan totalmente o degeneran en productos que resultan todavía tóxicos y que pueden provocar trágicas consecuencias a largo plazo.

Muchos expertos sostienen que la combinación de dispersantes y crudos puede ser más tóxica que el crudo en sí. Después del último vertido en el golfo de Méjico, la EPA ha realizado estudios que demuestran que los dispersantes no son una buena alternativa para paliar los efectos de los vertidos (Li et al. 2007; Chaîneaux et al. 2005; Kelkar et al. 2007; Saeki et al. 2009; Stockstad 2010).

Según lo descrito anteriormente, la biodegradación parece una alternativa muy efectiva para eliminar los hidrocarburos procedentes de los vertidos de petróleo en ambientes acuáticos.

Los estudios realizados describen que en casos de vertidos de importante magnitud, como en el caso del vertido del buque Exxon Valdez en 1989, o del Prestige en 2002 el 50% del crudo presente en el agua fue biodegradado durante los tres primeros años después del vertido (Vega et al. 2009).

Esta biodegradación puede acelerarse mediante la adición de nutrientes al medio para estimular el crecimiento de las poblaciones de microorganismos degradadores (Chaîneau et al. 2005; Atlas 1995).

Los equipos de respuesta frente a los vertidos deben tener en cuenta parámetros como el oxígeno presente en el ecosistema y el balance de nutrientes en el lugar del vertido. Si las circunstancias son tales que la adición de nutrientes sólo aceleran la biodegradación en un grado pequeño (Nokolopoulou & Kalogerakis 2008; Oh et al. 2001), entonces la decisión debe ser basada en la necesidad de acelerar la desaparición del petróleo para proteger un recurso vital o simplemente para acelerar la restauración del ecosistema. Si no hay una necesidad inmediata de proteger un recurso vital o restaurar el ecosistema, la atenuación natural puede ser la respuesta adecuada (Zhang et al. 2005).

La elección de los microorganismos empleados en estas biorremediaciones, sin embargo es un tema muy amplio y complejo.

Estudios recientes indican que la biorremediación puede ser una técnica útil para los vertidos de crudos ligeros, mientras que los vertidos de crudos pesados requieren métodos físicos de absorción (como boom, skimmer, etc.) antes de intentar abordar la biorremediación (Mohajeri et al. 2010).

En conclusión, la decisión de emplear métodos físicos o químicos frente a la biorremediación en un vertido de petróleo en ambientes acuáticos, depende de la zona del vertido, las condiciones físicas del mismo, los objetivos de protección del hábitat y cualquier otro factor que pudiera tener impacto en el proceso seleccionado.

Comparación entre los distintos microorganismos de Biorremediación

Se han realizado numerosos trabajos en el estudio de la biodegradación de hidrocarburos procedentes de vertidos de crudo de petróleo desde hace mucho tiempo (Kelkar et al. 2007; Obuekwe et al. 2009; Monteiro et al. 2009; Reddy & Quinn 1999). La mayoría de los estudios realizados hasta el momento trataban con organismos bacterianos (Rahman et al. 2002) pero el empleo de bacterias en la biodegradación plantea serios problemas en los ecosistemas donde se utilizan estos microorganismos como biodegradadores (Anderson et al. 2009; Wang et al. 2009).

En general, un aumento en una población bacteriana en una zona determinada procedente de un tratamiento de biorremediación, hace que aparezcan en el ecosistema en cuestión, numerosos productos tóxicos para la mayoría de las especies autóctonas procedentes de su metabolismo, lo que hace que sea necesario eliminarlas del medio una vez degradado el agente tóxico (Saeki et al. 2009).

Varios autores han descrito que los residuos de hidrocarburos degradados por bacterias son más tóxicos para los organismos acuáticos (embriones de peces, camarones y mejillones) de lo que se podía esperar (Pelletier et al. 2004; Dasa et al. 2007).

Además de esto las reservas de oxígeno y de nutrientes de las que dispone el ecosistema se ven alteradas si la presencia de estos organismos aumenta en una gran proporción, estimulada por el uso de hidrocarburos como fuentes de energía en estos microorganismos (Chaîneau et al. 2005).

Las bacterias son organismos que poseen, en general, una variabilidad genética pequeña, lo cuál dificulta su adaptación a ambientes extremos.

En lo referente a la degradación de hidrocarburos procedentes de vertidos de crudo de petróleo, sus rutas metabólicas de degradación son menos complejas que las de las microalgas y los productos obtenidos menos degradados, y en algunos casos incluso tóxicos (Lindstrom & Braddock, 2002).

Si consideramos por otro lado las algas como microorganismos degradadores, encontramos varias ventajas importantes frente al uso de bacterias en la biorremediación. En primer lugar, las algas poseen una complejidad mayor que las bacterias en lo que a dotación genética se refiere, lo que les permite una mayor variabilidad y plasticidad, y la posibilidad de adaptarse más rápido a condiciones desfavorables (Costas et al. 2010).

En cuanto a los productos de degradación obtenidos, las microalgas degradan los hidrocarburos procedentes del crudo de petróleo hasta el último nivel posible, es decir hasta CO_2 . Podríamos pensar que el crecimiento masivo de una población algal y por consiguiente el aumento de CO_2 procedente de la respiración emitido a la atmósfera, contribuiría al llamado efecto invernadero, pero numerosos estudios sobre el rendimiento fotosintético de las microalgas, demuestran que el balance de CO_2 entre fotosíntesis y respiración es favorable y no contribuye a agravar este problema (Carrera-Martinez et al. 2010).

Por último, es interesante mencionar que las microalgas constituyen el grupo más importante de productores primarios en los ecosistemas acuáticos. Son el primer nivel en las cadenas tróficas, de manera que frente a las bacterias, presentan algunas ventajas añadidas, como es su contribución al crecimiento de la fauna contenida en el medio, lo que supone una ventaja a su capacidad de degradación.

8. CONCLUSIONES

"Si uno no puede comunicar lo que ha estado haciendo, su trabajo carecerá de valor".

Erwin Schrödinger.

- Mediante un análisis de fluctuación adaptado a cultivos líquidos de fitoplancton, podemos determinar que la adaptación de *Scenedesmus intermedius*, *Dunaliella tertiolecta* y *Microcystis aeruginosa*, a crudos de petróleo y combustibles de base petrolífera se produce mediante raras mutaciones espontáneas preadaptativas.
- Las tasas de mutación para el patrón de petróleo fueron de 1.7×10^{-5} en *Microcystis aeruginosa*, 1.2×10^{-5} en *Dunaliella tertiolecta*, y de 1.3×10^{-5} en *Scenedesmus intermedius*.
- Las tasas de mutación para el patrón de diesel fueron de 1.8×10^{-5} en *Microcystis aeruginosa*, 1.3×10^{-5} en *Dunaliella tertiolecta*, y de 1.5×10^{-5} en *Scenedesmus intermedius*.
- Conociendo los factores que influyen en los mecanismos de adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos podemos seleccionar y cultivar mediante selección artificial, mutantes resistentes de las especies de microalgas. Mediante un sistema de ratchet podemos seleccionar mutantes mejorados, para distintos contaminantes antropogénicos entre los que se encuentran petróleo, diesel.
- Tras desarrollar un nuevo procedimiento para estimar la heredabilidad en los experimentos de ratchet, hemos comprobado que a bajas dosis de petróleo y diesel los componentes genéticos juegan un papel pequeño en la adaptación, incrementándose progresivamente hasta llegar a las dosis mas elevadas, en las que solamente los componentes genéticos garantizan la capacidad de adaptación en las especies de *Scenedesmus*, *Dunaliella* y *Microcystis*.

- Una vez obtenidos mediante selección y mejora los mutantes resistentes a los contaminantes antropogénicos estudiados (petróleo y diesel), los resultados indican que las especies ensayadas pueden utilizarse como organismos biorremediadores para ecosistemas acuáticos contaminados con crudos de petróleo o combustibles derivados, con una tasa de degradación del 49% para *Scenedesmus obtusus* y del 74% para *Scenedesmus rapaporti*.
- Estudiando el mecanismo que les confiere la resistencia a los cultivos seleccionados podemos decir que la adaptación de las especies mencionadas a los contaminantes estudiados, se produce mediante un mecanismo de biodegradación del contaminante y no de bioacumulación como ocurre con otros contaminantes antropogénicos.

9. BIBLIOGRAFÍA

Aksmann, A., Tukaj, Z., 2008. Intact anthracene inhibits photosynthesis in algal cells: A fluorescence induction study on *Chlamydomonas reinhardtii* cw92 strain. *Chemosphere*.74, 26.

Alvarez L.W. , Alvarez, W., Asaro, F., Michel, H.V. 1980. Extraterrestrial Cause for the Cretaceous-Tertiary extinction. *Science*. 208:1095-1108.

Anderson, B.S., Arenella-Parkenson, D., Phillips, B., Tjeerdema, R. & Crane, D. . 2009. Preliminary investigation of the effects of dispersed Prudhoe Bay Crude Oil on developing topmelt embryos, *Atherinops affinis*. *Environmental Pollution*. 157(3): 1058-1061.

Arthur, M. A., R. E. Garrison, Cyclicity in the Milankovitch band through geologic time: An introduction. *Paleocenography*. 1:369-386.

Atlas, R.M. 1995. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, Volume 31 (4): 178-182.

Baos, R., Garcia-Villada, L., Agrelo, M., López-Rodas, V., Hiraldo, F., Costas, E., 2002. Short-term adaptation of microalgae in highly stressful environments: an experimental model analyzing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (*Chlorophyceae*) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. *European Journal of Phycology*. 37, 593–600.

Belkin IM, Cornillon PC, Sherman K. (2009). Fronts in Large Marine Ecosystems. *Progress in Oceanography*. 81: 223-236.

Berner, R.A., Lasaga, A.C. & Garrels, R.M. 1983. The carbonate-silicate geochemical cycle and its effects on atmospheric carbon dioxide over the past 100 million years. *American Journal of Science*.283:641-683.

Blount ZD, Borland CZ, Lenski RE. (2008). Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 10: 7899-7906.

Bopp, S.K., Lettieri,T., 2007. Gene regulation in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Gene*. 396, 293-302.

Carrera-Marinez, D., Mateos, A., Lopez-Rodas, V. & Costas, E. 2010. Microalgae reponse to petroleum spill: An experimental model analysing physiological and genetic reponse of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to oil samples from the tanker Prestige. *Aquatic Toxicology*. 97:151-159.

Carrera-Martinez, D., Mateos-Sanz, A., López-Rodas, V., Costas, E., 2011. Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination. *Aquatic Toxicology*. 101, 342-350.

Chaillan, F., Gugger, M., Saliot, A., Couste, A. & Oudot, J. 2006. Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat. *Chemosphere* 62 (19): 1574-1582.

Chaineau, C.H., Rougeux, G., Yepremian, C. & Oudot, J. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37 (8): 1490-1497.

Costas, E., Carrillo, E., Ferrero, L.M., Agrelo, M., Garcia-Villada, L., Juste, J., López-Rodas, V., 2001. Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea herbicide. *Phycologia*. 40, 391-398.

Costas, E., Flores-Moya, A., Perdignes, N., Maneiro, E., Blanco, J.L., García, M.E., López-Rodas, V., 2007. How eukaryotic algae can adapt to the Spain's Rio Tinto: a neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem. *New Phytologist*. 175, 334-339.

Costas, E., Flores-Moya A., López-Rodas V., 2008. Rapid adaptation of phytoplankters to geothermal waters is achieved by single mutations: were extreme environments 'Noah's Arks' for photosynthesizers during the Neoproterozoic 'snowball Earth'? *New Phytologist*. 180, 922-932.

Crow JF, Kimura M. (1970). An Introduction to Population Genetics Theory. In *Harper and Row* (eds) New York, NY, USA. 2005.

Crutzen P.J., (2006). The "Anthropocene". Earth System Science in the Anthropocene. Eckart Ehlers & Thomas Krafft editors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Part 1, pp 13-18.

Dahl, E., Laake, M., Tjessem, K., Eberlein, K., Bohle, B., 1983. Effects of Ekofisk crude oil on an enclosed planktonic ecosystem. *Marine Ecology progress Series*. 14, 81-91.

Dasa, K. & Mukherjee, A. Crude petroleum-oil biodegradation by naturally Inhabiting Mixed Bacterial Culture under Different Environmental Factors. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4: 1211-1218. 1999.

Dasa, K. & Mukherjee, A. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology* 98 (7): 1339-1345. 2007.

Dawes, C. J. , 1998. Marine Botany (2nd ed). J. Wiley & Sons, Inc. New York,USA.

Elshafie, A., Yahya, A., Sultan, A., Busaidi, A., Bakheit, C. & S.N. Albahry. Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman. *Marine Pollution Bulletin* 54 (11): 1692-1696. 2007.

El-Sheekh, M. M., El-Naggar, A. H., Osman, M.E.H., Haieder,A., 2000. Comparative studies on the green algae *Chlorella homosphaera* and *Chlorella vulgaris* with respect to oil pollution in the river Nile. *Water Air and Soil Pollution*. 124, 187-204.

Fabregas, J., Herrero, C., Veiga,M., 1984. Effect of oil and dispersant on growth and chlorophyll-A content of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 47, 445-447.

Falconer, D. S. 1981. And Introduction to Quantitative Genetics. Mackay. Editorial

Falkowski PG, Barber RT, Smetacek V (1998) Biogeochemical controls and feedbackson ocean primary production. *Science*. 281: 200-206.

Falkowski, P.G., Raven, J.A., 1997. Aquatic photosynthesis. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publishers, 375.

Fisher RA. (1930). The genetical theory of natural selection. *Oxford University*, Oxford.

Flores-Moya, A., Costas, E., Bañares-España, E., García-Villada, L., Altamirano, M., López-Rodas, V., 2005. Adaptation of *Spirogyra insignis* (*Chlorophyta*) to an extreme natural environment (sulphureous waters) through preselective mutations. *New Phytologist*. 166, 655-661.

Flores-Moya A, Costas E, López-Rodas V. (2008). Roles of adaptation, chance and history in the evolution of the dinoflagellate *Prorocentrum triestinum*. *Naturwissenschaften* 95: 697–703.

Flores-Moya A, Rouco M, Garcia-Sanchez MJ, Garcia-Balboa C, Gonzalez R, Costas E & Lopez-Rodas V. (2012). Effects of adaptation, chance, and history on the evolution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* under selection of increased temperature and acidification. DOI: 10. 1002/ece3. 198.

Fontdevila, A., J. Méndez, F.J. Ayala and J. McDonald. 1975. Maintenance of allozyme polymorphism in experimental populations of *Drosophila*. *Nature* 255:365-380.

C. García-Balboa, B. Baselga-Cervera, A. García-Sánchez, J.M. Igual, López-Rodas, V., E. Costas. Rapid adaptation of microalgae to extremely polluted waterbodies from uranium mining: an explanation of how the mesophilic organisms can rapidly colonize extremely toxic environments. *Aquatic Toxicology*. 144–145: 116–123.

García-Villada, L., López-Rodas, V., Bañares-España, E., Flores-Moya, A., Agrelo, M., Martín-Otero, L., Costas, E., 2002. Evolution of microalgae in highly stressing environments: an experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (*Chlorophyceae*) from sensitive to resistance against 2,4,6,-trinitrotoluene by rare preselective mutations. *Journal of Phycology*. 38, 1074-1081.

García-Villada, L., Rico, M., Altamirano, M., Sánchez-Martín, L., López-Rodas, V., Costas, E., 2004. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterisation and future implications in the use of copper sulphate as algacide. *Water Research* . 38, 2207-2213.

Gould, S.J., 2002. The structure of evolutionary theory. *Harvard University Press*, Cambridge, A, USA.

Gould SJ, Lewontin RC. (1979). Spandrels of San-Marco and the Panglossian Paradigm: critique of the adaptationist program. *Proceedings of the Royal Society B* 205: 581–598.

Hallam, A., 1986. The Pliensbachian and Tithonian extinction events. *Nature*. 319, 765 - 768.

Hansen J, Sato M, Ruedy R, Lacis A, Oinas V. (2000). Global warming in the twenty-first century: an alternative scenario. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 9875–9880.

Huertas, I.E., Rouco, M., López-Rodas, V., Costas, E., 2010. Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. *New Phytologist*. 188, 478–487.

Huertas IE, Rouco M, López-Rodas V, Costas E. (2011). Warming will affect phytoplankton differently: evidence through a mechanistic approach. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences*. 278: 3534-3543.

Hughes, L. (2000) Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends in Ecology and Evolution* 15: 56-61.

Hughey, C., Galasso, S.A. & Zumberge, J.E. Detailed compositional comparison of acidic NSO compounds in biodegraded reservoir and surface crude oils by negative ion electrospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Fuel* 86 (5-6): 758-768. 2007.

IPCC 2013, Working Group I Technical Support Unit.

Incardona, J., Carls, M., Day, H.L., Sloan, C., Bolton, J., Collier, T. & Scholz, N., 2009. Cardiac Arrhythmia Is the Primary Response of Embryonic Pacific Herring (*Clupea pallasii*) Exposed to Crude Oil during Weathering. *Environ. Sci. Technol.* 43 (1): 201–20.

Kelkar, D.S., Kumar, a.R. & Zinjarde, S.S., 2007. Hydrocarbon emulsification and enhanced crude oil degradation by lauroyl glucose ester. *Bioresource Technology* 98(7): 1505-1508.

Kimura M. (1983). The neutral theory of molecular evolution. *Cambridge University Press*, Cambridge.

Kirk, J.T.O., 1994. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems, 2nd edn. New York, NY, USA: *Cambridge University Press*, 256.

Kobayashi, T., Murai, Y., Tatsumi, K. & Iimura, Y. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. enhanced by water-extractable organic matter from manure compost. *Science of The Total Environment*, In Press. DOI: 10.1016/j.scitotenv. 2009.06.041.

Komukai-Nakamura, S., Sugiura, K, Yamauchi-Inomata, Y., Toki, H., Venkateswaran, K., Yamamoto, S., Tanaka, H. & Harayama, S. 1996. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82 (6): 570-574.

Lewontin, R.C. 1974. The Genetic Basis of Evolutionary Change (New York: Columbia University Press.

Li, Z., Kepkay, P., Lee, K., King, T., Boufadel, M.C. & Venosa, A., 2007. Effects of chemical dispersants and mineral fines on crude oil dispersion in a wave tank under breaking waves. *Marine Pollution Bulletin* 54 (7): 983-993.

Lindstrom, J.E. & Braddock, J.F., 2002. Biodegradation of petroleum hydrocarbons at low temperature in the presence of the dispersant Corexit 9500. *Marine Pollution Bulletin* 44 (8): 739-747.

López-Rodas, V., Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L., Larrauri, A., Martín-Otero, L. Costas, E., 2001. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *European Journal of Phycology*. 36, 179-190.

López-Rodas, V. Carrera-Martínez,, D., Salgado, E., Mateos-Sanz, A., Báez, J.C. & E Costas, E., 2009. A fascinating example of microalgal adaptation to extreme crude oil contamination in a natural spill in Arroyo Minero, Río Negro, Argentina. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 75 (4): 883-899.

López-Rodas, V., Costas, E., Bañares, E., García-Villada, L., Altamirano, M., Rico, M., Salgado, C., Flores-Moya, A., 2006. Analysis of polygenic traits of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) strains by Restricted Maximum Likelihood (REML) procedures: 2. Microcystin net production , photosynthesis and respiration. *Phycologia*. 45, 243-248.

López-Rodas, V., Marvá, F., Rouco, M., Costas, E., Flores-Moya, A., 2008a. Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to stressful acidic, mine metal-rich waters as result of pre-selective mutations. *Chemosphere*. 72, 703-707.

López-Rodas, V., Marvá, F., Costas, E., Flores-Moya, A., 2008b. Microalgal adaptation to a stressful environment acidic, metal-rich mine waters from Mynydd Parys (N Wales, UK) could be due to selection of pre-selective mutants originating in non-extreme environments. *Environmental and Experimental Botany*. 64, 43-48.

Lopez-Rodas, V. García-Balboa, C., Baselga-Cervera, B., Costas, E. 2014. Estimating the genetic capability of different phytoplankton organisms to adapt to climate warming. *Oceanography*, Open Access. in press.

Luria, S.E., Delbruck, M., 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*. 28, 491-511.

Marvá, F., López-Rodas, V., Rouco, M., Navarro M. C., Toro, F. J., Flores- Moya, A. and Costas, E. 2010. Human-synthesized pollutants drive emergence of evolutionary novelties: pre-selective mutations confer resistance to the herbicides simazine and diquat in green microalgae. *Aquat Toxicol*. 31,96(2):130-4.

Mckew, B., Coulon, F., Yakimov, M., Denaro, R., Genovese, M., Smith, M., Cindy, J., Osborn, A.M., Timmis, K. & McGenity, T., 2007. Evidence for in situ crude oil biodegradation after prestige oil spill. *Environmental Microbiology*. 9(6):1562-1571.

Medina-Bellver, J., Marin, P., Delgado, A., Rodriguez-Sanchez, A., Reyes, E., Ramos, J.L. & Marques, S., 2005. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environmental Microbiology*. 7(6):773-779.

Meehl GA, Arblaster JM, Tebaldi C. (2007). Contributions of natural and anthropogenic forcing to changes in temperature extremes over the United States. *Geophysical Research Letters*. 34: 19.

Meehl, G.A., Stocker, T.F., Collins, W.D., Friedlingstein, P., Gaye, A.T., Gregory, J.M., Kitoh, A., Knutti, R., Murphy, J.M., Noda, A., Raper, S.C.B., Watterson, I.G., Weaver, A.J. and Zhao, Z.-C. (2007). Global Climate Projections. In 'Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change'. (Eds S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller). pp. 747-845. *Cambridge University Press*: Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Myers N, Knoll AH (2001) The biotic crisis and the future of evolution. *Proceeding of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 5389-5392.

Mohajeri, L., Aziz, H., Isa, M. & Zahed, M., 2010. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. *Bioresource Technology* 101 (3): 893-900.

Nayar, S., Goh, B. P. L., Chou, L. M., 2005. Settlement of marine periphytic algae in a tropical estuary. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 64, 241-248.

Nikolopoulou, M. & Kalogerakis, N., 2008. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Marine Pollution Bulletin* 56 (11) : 1855-1861.

Novick, A., Szilard, L., 1950. Experiments with the chemostat on spontaneous mutations in bacteria. *Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America*. 36, 708.

Nyholm, N., & Peterson, H.G. 1997. Laboratory bioassays with microalgae. CRC press Florida.

Obayori, O., Adebuseye, S., Adewale, A., Oyetibo, G., Oluyemi, O., AMokun, R. & Ilori, M., 2009. Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four *Pseudomonas* strains. *Journal of Environmental Sciences* 21 (2):243-248.

Obuekwe, C., Al-Jadi, Z. & Al-Saleh, E., 2009. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63 (3): 273-279.

Ogden, D.E., & Sleep, N.H., 2012. Explosive eruption of coal and basalt and the end-Permian mass extinction. *Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America*. 109:59-62.

Oh, Y., Sim, D. & Kim, S., 2001. Effects of Nutrients on Crude Oil Biodegradation in the Upper Intertidal Zone. *Marine Pollution Bulletin* 42 (12): 1367-1372.

Orellana G, López-Rodas V, Costas E, Maneiro E, Haigh D. Biosensores basados en microalgas para la detección de contaminantes medioambientales. CT/ES2008/000465, 2008, P200701905.

Padros, J., Pelletier, E., Siron, R., Delille, D., 1999. Fate of a new silicone-based oil-treating agent and its effects on marine microbial communities. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18, 819–827.

Palumbi, S.R. 2001. Evolution—Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*. 293: 1786-1790.

Pelletier, E., Delille, D. & Delille, B., 2004. Crude oil bioremediation in sub-Antarctic intertidal sediments: chemistry and toxicity of oiled residues. *Marine Environmental Research* 57 (4): 311-327.

Rahman, K. Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P. & Banat, I.M., 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology* 85(3): 257-261.

Reboud, X., Majerus, N., Gasquez, J., Powles, S., 2007. *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system for pro-active herbicide resistance evolution research. *Biological Journal of Linnean Society*. 91, 257-266.

Reddy, C.M. & Quinn, J.G., 1999. GC-MS analysis of total petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater samples after the North Cape oil spill. *Marine Pollution Bulletin* 38 (2): 126-135.

Romero-Lopez, J., Lopez-Rodas,V., Costas, E.. 2012. Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination. *Aquat Toxicol*, 124–125, 227-237.

Rouco M, López-Rodas V, Flores-Moya A, Costas E. (2011). Evolutionary changes in growth rate and toxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* under a scenario of eutrophication and temperature increase. *Microbial Ecology* 62: 265-273.

Saeki, H., Sasaki, M., Komatsu, K., Miura, A. & Matsuda, H., 2009. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. *Bioresource Technology* 100(2): 572-577.

Salas, N., Ortiz, L., Gilcoto, M., Varela, M., Bayona, J.M., Groom, S., Alvarez-Salgado, X.A., Albaigés, J., 2006. Fingerprinting petroleum hydrocarbons in plankton and surface sediments during the spring and early summer blooms in the Galician coast (NW Spain) after the Prestige oil spill. *Marine Environmental Research*. 62, 388-413.

Santana-Silva, A.M., Pimentel, M.F., Raimundo, I. & Almeida, Y., 2009. Effect of plasticizers on a PVC sensing phase for evaluation of water contamination by aromatic hydrocarbons and fuels using infrared spectroscopy. *Sensors and Actuators B: Chemical* 139 (1): 222-230.

Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W., 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*. 10, 51-62.

Sikkema, J., Bont, J.A., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbial Molecular Biology*. 59, 201-222.

Singh, A.K., Gaur, J.P., 1988. Effect of assam crude on photosynthesis and associated electron-transport system in *Anabaena doliolum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 41, 776-780.

Smit, J. & Kate, W.G., 1982. Trace element patterns at the Cretaceous Tertiary boundary: consequences of a large impact. *Cretaceous Research*. 3:307-332.

Siron, R., Pelletier, E., Roy, S., 1996. Effects of dispersed and adsorbed crude oil on microalgal and bacterial communities of cold seawater. *Ecotoxicology*. 5, 229-251.

Sniegowski, P.D., Lenski, R.E., 1995. Mutation and adaptation: the directed mutation controversy in evolutionary perspective. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. 26, 553-578.

Sniegowski, P.D., 2005. Linking mutation to adaptation: overcoming stress at the spa. *New Phytologist*. 166, 360-362.

Spiess EB. (1989). Genes in populations. Wiley, New York.

Stepaniyan, O. V., 2008. Effects of crude oil on major functional characteristics of macroalgae of the Barents Sea. *Russian Journal of Marine Biology*. 34, 131-134.

Stokstad, E. Dispersant Study Released by EPA, But Big Questions Remain. *Science* 30 Jun 2010.

Suderman, K., Thistle, D., 2004. The relative impacts of spills of two alternative fuels on the microalgae of a sandy site: a microcosm study. *Marine Pollution Bulletin*. 49, 473-478.

Tewari, V., Tewari, K.N., Singh, B.D., 2001. Comparative studies of cytokinins on in vitro propagation of *Bacopa monniera*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 66, 9-16.

Trejo-Hernández, M.R., Ortiz, A., Okoh, A.I., Morales, D. & Quintero, D. Biodegradation of heavy crude oil Maya using spent compost and sugar cane bagasse wastes. *Chemosphere* 68 (5): 848-855. 2007.

Trolio, R. Grice, K., Fisher, S.J. Alexander, R. & Kagi, R.I., 1999. Alkylbiphenyls and alkyl diphenylmethanes as indicators of petroleum biodegradation. *Organic Geochemistry*, 30(10): 1241-1253.

Varela, M., Bode, A., Lorenzo, J., Álvarez-Ossorio, M.T., Miranda, A., Patrocinio, T., Anadón, R., Viesca, L., Rodríguez, N., Valdés, L., Cabal, J., Urrutia, A., García-Soto, C., Rodríguez, M., Álvarez-Salgado, X.A., Groom, S., 2006. The effect of the “Prestige” oil spill on the plankton of the N–NW Spanish coast. *Marine Pollution Bulletin*. 53, 272-286.

Vega, F., Covelo, E., Reigosa, M. & Andrade, M.L., 2009. Degradation of fuel oil in salt marsh soils affected by the Prestige oil spill. *Journal of Hazardous Materials* 166 (2-3): 1020-1029.

Venosa, A.D. & Zhu, X., 2003. Biodegradation of Crude Oil Contaminating Marine Shorelines and Freshwater Wetlands. *Spill Science & Technology Bulletin* 8, (2): 163-178.

Wang, Y., Zhou, Q., Peng, S., Ma, Q., Niu, X., 2009. Toxic effects of crude-oil-contaminated soil in aquatic environment on *Carassius auratus* and their hepatic antioxidant defence system. *Journal of Environmental Sciences*. 21, 612-617.

Western, D. 2001. The Geographic Mosaic of Coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA. 98:5458-5465.

Winkelmann, M., Hunger, N., Hüttl, R. & Wolf, G., 2009. Calorimetric investigations on the degradation of water insoluble hydrocarbons by the bacterium *Rhodococcus opacus* 1CP. *Thermochimica Acta* 482 (1-2): 12-16.

Woodruff, D. S., 2001. Declines of biomes and biotas and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA. 98, 5471–5476.

Yang, S., Jin, H., Wei, Z., He, R., Ji, Y., Li, X. & Yu, S., 2009. Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review. *Pedosphere* 19 (3): 371-381.

Zhang, G., Wu, Y. Qian, X. & Meng, Q., 2005. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University Science* 6 (8): 725-730.

Zinjarde, S.S. & Pant, A.A., 2002. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. *Marine Pollution Bulletin* 44(2): 118-121.

ANEXO



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination

Julia Romero-Lopez, Victoria Lopez-Rodas, Eduardo Costas*

Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, E-28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2012

Received in revised form 2 August 2012

Accepted 4 August 2012

Keywords:

Adaptation

Mutation

Microalgae

Crude oil

Diesel oil

Bioremediation

ABSTRACT

There is increasing scientific interest in how phytoplankton reacts to petroleum contamination, since crude oil and its derivatives are generating extensive contamination of aquatic environments. However, toxic effects of short-term petroleum exposure are more widely known than the adaptation of phytoplankton to long-term petroleum exposure. An analysis of short-term and long-term effects of petroleum exposure was done using experimental populations of freshwater (*Scenedesmus intermedius* and *Microcystis aeruginosa*) and marine (*Dunaliella tertiolecta*) microalgae isolated from pristine sites without crude oil product contamination. These strains were exposed to increased levels of petroleum and diesel oil. Short-term exposure to petroleum or diesel oil revealed a rapid inhibition of photosynthetic performance and cell proliferation in freshwater and marine phytoplankton species. A broad degree of inter-specific variation in lethal contamination level was observed. When different strains were exposed to petroleum or diesel oil over the long-term, the cultures showed massive destruction of the sensitive cells. Nonetheless, after further incubation, some cultures were able to grow again due to cells that were resistant to the toxins. By means of a fluctuation analysis, discrimination between cells that had become resistant due to physiological acclimatization and resistant cells arising from rare spontaneous mutations was accomplished. In addition, an analysis was done as to the maximum capacity of adaptation to a gradual contamination process. An experimental ratchet protocol was used, which maintains a strong selection pressure in a temporal scale up to several months over very large experimental populations of microalgae. Microalgae are able to survive to petroleum contamination as a result of physiological acclimatization without genetic changes. However, when petroleum concentration exceeds the physiological limits, survival depends exclusively on the occurrence on mutations that confer resistance and subsequent selection of these mutants. Finally, it is certain that further mutations and selection will ultimately determine adaptation of microalgae to the environmental forcing.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Currently, the extinction rate of species is estimated to be 500-fold higher than earlier as a consequence of anthropogenic global change (Woodruff, 2001). Little is known about the biodiversity crisis in organisms as important as microbes. However, studies on the adaptation of microbes to anthropogenic global change are indispensable, as dependable nutrient cycles may become unpredictable as essential microbes succumb to contaminants (Woodruff, 2001). In particular, the tolerance of microalgae to anthropogenic change is extremely relevant since these organisms are the primary producers of aquatic ecosystems (Kirk, 1994; Falkowski and Raven, 1997).

Species collapse can be mainly attributed to the incapacity of organisms to cope with drastic environmental anthropogenic changes occurring in their habitats. Aquatic contamination is an important cause of this species collapse and accidental spills of crude oil or crude oil products in aquatic ecosystems are one of the most worrisome environmental problems. There is increasing scientific interest in how phytoplankton reacts to petroleum contamination, because extraction, processing, transport, storage and use of crude oil and its derivatives are generating extensive contamination of aquatic environments.

Crude oil is a mixture of up to 10,000 different types of highly toxic hydrocarbons, which produce great damage to life (Dawes, 1998). Moreover, experimental studies on the effect of crude oil and petroleum products on microalgae have shown contradictory results. On one hand, petroleum usually inhibits photosynthesis and growth of microalgae (Dahl et al., 1983; Siron et al., 1996; Stepaniyan, 2008; Nayar et al., 2005). Petroleum and its derivatives interfere with the photosynthetic apparatus inhibiting the

* Corresponding author.

E-mail address: ecostas@vet.ucm.es (E. Costas).

function of photosystem II (Singh and Gaur, 1988; Aksmann and Tukaj, 2008). Petroleum also alters membrane integrity and function (Sikkema et al., 1995), and chloroplasts become disorganized and lose functionality (Wang et al., 2009; Zhang et al., 2005). Algae exposed to crude oil products show reduced DNA, RNA, and protein content (El-Sheekh et al., 2000). Exposure to PAHs reduces expression of genes for photosynthetic pigments (Bopp and Lettieri, 2007).

Although phytoplankton usually experiences local extinction in crude oil polluted waters, it can also survive the harmful effects of petroleum products by some kind of adaptation. Several studies have reported scarce effect of crude oil on some phytoplankton species (Fabregas et al., 1984; Padros et al., 1999).

A fascinating example of adaptation of microalgae to extreme contamination by crude oil was described in the Arroyo Minero River (AMR), Argentina (Lopez-Rodas et al., 2009; Carrera-Martinez et al., 2011). Underground crude oil has constantly leaked out since 1915 in AMR as a consequence of test drilling for petroleum exploitation. However, four microalgae species *Symploca dubia*, *Chlamydomonas dinobryonis*, *Scenedesmus obtusus* and *Scenedesmus* sp. proliferate in contact with crude oil. An attempt to elucidate the mechanisms involved in adaptation of microalgae to crude oil contamination show that *Scenedesmus* sp. can adapt to low concentrations of petroleum ($\leq 3\%$, v/v crude oil/water) by means of physiological acclimatization. In addition, only rare crude oil-resistant variants are able to grow under high levels of crude oil (around 10%, v/v crude oil/water). These crude oil-resistant mutants have arisen through a rare spontaneous mutation that occurred prior to crude oil exposure (Carrera-Martinez et al., 2011). A similar result was previously observed in *Dunaliella tertiolecta* in the presence of petroleum spillage from the oil tanker Prestige (Carrera-Martinez et al., 2010).

Despite this, the adaptation of phytoplankton to crude oil exposure is still poorly understood and documented. A single resistant mutation is enough to assure the survival of some microalgae variants under crude oil contamination (Carrera-Martinez et al., 2010, 2011). However, evolutionary theory assumes that adaptation to extreme conditions depends on the occurrence of several mutations that confer resistance and subsequent selection of such mutations (reviewed by Gould, 2002). After the occurrence of the first mutation conferring resistance, selection of new mutations should play an important role in the adaptive process.

The aim of the present work was to assess the short-term and long-term toxic effects of petroleum and diesel oil contamination (chosen as a representative example for the anthropogenic contamination forcing) on marine and freshwater phytoplankton in order to evaluate their potential for adaptation. This study provides experimental evidence for assessing how phytoplankton might respond and evolve to petroleum product contamination in the near future. Even though this study might be considered an oversimplification of reality, the evolutionary-ecological approach followed here constitutes a way to explore, through a rigorous experimental model, the capability of microalgae to adapt to petroleum and petroleum derivative contamination.

2. Material and methods

2.1. Experimental organisms and culture conditions

One strain (SiD1) of *Scenedesmus intermedius* Chodat (Chlorophyta), one strain (MaD3) of *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (Cyanoprokariota) both isolated from a pristine lagoon in Doñana National Park, SW Spain (DNP), and one strain (DtM1) of

D. tertiolecta Butcher isolated from a protected area from Bocche di Bonifacio (N. Sardegna Island; Italy) were selected for the experiments. No crude oil product spills were documented in their proximities. Cultures were grown axenically in cell-culture flasks (Greiner; Bio-One Inc., Longwood, 46 NJ, USA) containing 20 ml of BG11 or F/2 medium (Sigma–Aldrich) for SiD1 and MaD3 or DtM1, respectively. Flasks were placed at 22 °C under a continuous photon flux density of $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the waveband 400–700 nm provided by cool white fluorescent tubes. Cultures were maintained in mid-log exponential growth by serial transfers of cell inoculums of 6×10^5 cells to fresh medium. Under these conditions, the culture grew asexually.

Before the experiments, cultures were re-cloned by isolating a single cell in order to avoid the inclusion of any previous spontaneous mutants that might have been accumulated in the culture. Only cultures without detectable bacteria were used in the experiments. The absence of bacteria was tested by direct examination using an epifluorescence microscope after staining with acridine orange.

2.2. Initial toxicity test

A special standard Fluka Analytical Petroleum Special (Sigma–Aldrich Chemie, GmbH, Ch-9471, Buchs, Germany Ref 77370) and Diesel Oil Standard (Sigma–Aldrich Chemie, GmbH, Ch-9471, Buchs, Germany Ref w1361) were used as selective agents (analytical standards were used to assure repeatability). Petroleum standard has 18% of aromatic hydrocarbons. The selective agents were used at concentrations of 0.15%, 0.45%, 1.5%, 3%, 9%, 12% (v/v) diluted in BG-11 medium. To mix the petroleum or diesel oil and culture medium adequately, the ingredients were sonicated (4 pulses of 10 s each with a power of 40 W and a frequency of 16 kHz) with a Vibra Cell sonicator (Sonics & Materials, Inc., Danbury, CT, USA) maintaining the tubes within a bucket of crushed ice during the process.

The effect of increasing concentrations of petroleum or diesel oil on photosynthetic performance of SiD1 and DtM1 strains was tested by measuring changes in the effective quantum yield of photosystem II (ϕPSII). Triplicate samples of petroleum-exposed and control cultures were measured using a ToxY-PAM fluorimeter (Walz, Effeltrich, Germany). The measurements were taken 48 h after petroleum addition to assure exposure during a complete cell cycle. Effective quantum yield was calculated as follows:

$$\phi\text{PSII} = \frac{F_m' - F_t}{F_m'}$$

where F_m' and F_t are the maximum and the steady-state fluorescence of light-adapted cells, respectively (Schreiber et al., 1986).

The toxic effect of the crude oil, petroleum standard or diesel oil was also estimated by calculating acclimated maximal growth rate (r) in triplicates of mid-log exponentially growing cultures, in the presence of increasing concentrations of petroleum, according to Crow and Kimura (1970) equation:

$$r = \frac{\log(N_t/N_0)}{t}$$

where N_t and N_0 are the cell numbers at the end and at the beginning of the experiment, respectively, and $t = 5$ days is the time that cultures were exposed to increasing concentrations of crude oil and petroleum.

Experimental cultures and controls were blind-tested (i.e. the person counting the test did not know the identity of the tested sample), using a haemocytometer and an inverted microscope (Axiovert 35; Zeiss).

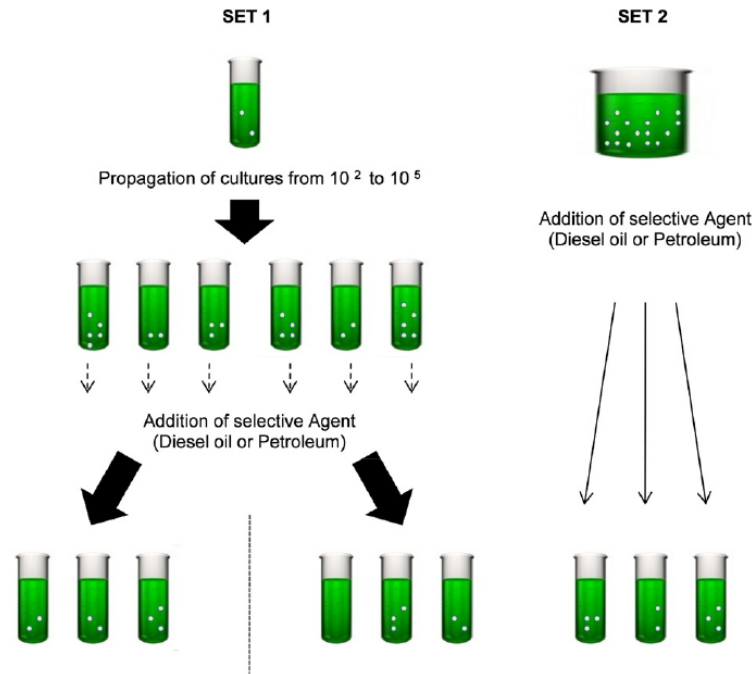


Fig. 1. Scheme of Luria and Delbrück modified fluctuation analysis for liquid cultures of phytoplankton by Lopez-Rodas et al. (2001).

2.3. Fluctuation analysis

A fluctuation analysis for liquid cultures of microalgae (Costas et al., 2001; Lopez-Rodas et al., 2001) was carried out to study the adaptation from sensitivity to resistance against petroleum or diesel oil (Fig. 1). This procedure distinguishes between two types of resistant cells. One type originates through physiological acclimatization (induced by petroleum or diesel oil exposure). The second type of resistant cell arises from random spontaneous pre-selective mutations, which occur during the growth of microalgae prior to petroleum or diesel oil exposure.

In the Set 1 experiment, 50 parallel sterile Pyrex culture tubes (Pyrex, Barloworld Scientific Ltd, Stone, UK) of 13 ml, were inoculated with $N_0 = 10^2$ wild-type cells of *M. aeruginosa* (MaD3), *D. tertiolecta* (DtM1) or *S. intermedius* (SiD1). This is a number small enough to virtually ensure that no pre-existing mutants were present. Cultures were grown axenically in 4 mL BG11 medium under non-selective conditions. When each culture flask reached the appropriate number of cells ($N_t \approx 10^5$ cells), the selective agent (petroleum or diesel oil) was added. Fluctuation analyses were carried out using 3 different concentrations of petroleum and diesel oil (3%, 9% and 21%, v/v petroleum or diesel oil/water, respectively). Simultaneously, in Set 2 controls, 25 sterile Pyrex culture tubes (Pyrex, Barloworld Scientific Ltd, Stone, UK) were inoculated with 10^5 cells of SiD1, MaD3 or DtM1, respectively, from each parental population. The selective agent (petroleum or diesel oil) was added using the same concentrations as in Set 1. Set 1 experiments and Set 2 controls were grown under selective conditions for 60 days ensuring that a single mutant cell would be able to generate enough progeny to be detected. Resistant cells in each culture were counted using an inverted microscope. Samples were blindly counted by at least two independent observers.

According to Luria and Delbrück (1943), two different results can be found as the independent consequence of two distinct phenomena of adaptation (Fig. 1). In the first case, if resistant cells appear as rare pre-selective mutations, which randomly occur during the time in which the cultures grew from N_0 to N_t prior to petroleum or diesel oil exposure, then mutations would occur earlier in some cultures, later in others or might not occur at all. As a result, a high variation in the number of resistant cells per culture would be found. By contrast, if resistant cells arose by physiological acclimatization induced by the selective agent, every cell is capable of having the same chance of developing resistance, since the cells have acquired resistance after addition of the selective agent. Therefore, the variation in the number of resistant cells per culture would be low. The Set 2 cultures are the experimental controls of the fluctuation analysis (Fig. 1). If the variance/mean ratio of Set 1 is significantly greater than the variance/mean ratio of Set 2, then there is fluctuation. This confirms that resistant cells arose by rare mutations that occurred prior to petroleum exposure. If a similar variance/mean ratio between Set 1 and Set 2 is found, then no fluctuation has occurred. This confirms that resistant cells developed by physiological acclimatization induced by petroleum exposure. Also, another result with zero resistant cells in each culture could be found indicating that neither selection of spontaneous mutations that occur prior to petroleum exposure, nor specific adaptation during the petroleum exposure took place.

The fluctuation analysis also allows for the estimate of mutation rate as:

$$\mu = -\frac{\log_e P_0}{N_t - N_0} \quad (\text{Luria and Delbrück, 1943})$$

where P_0 is the proportion of cultures of Set 1 showing non-resistant cells.

2.4. Ratchet selection

The experimental system used here aims at reaching equilibrium between strong selection intensity, by means of ratcheting to increase petroleum or diesel oil concentrations and the maintenance of a population size large enough to increase probability of rare spontaneous mutations that confer adaptation. These mutations occur randomly and cultures must be ratcheted only up to a concentration that supports population growth as well as being exposed to different selection levels. This procedure allows estimating the maximal capability for adaptation of a microalgae under increasing concentrations of selective agents (Reboud et al., 2007; Huertas et al., 2010, 2011).

During the initial phase, a control culture containing growth medium and three experimental cultures for each initial concentration of petroleum or diesel oil treatments were prepared. The selected initial concentrations were 0.15, 0.45 and 1.5% (v/v) diluted in BG-11 medium as previously described. Each culture was grown in culture tubes with screw cap (BRAND, Otto-Schott Str. 2597877 Wertheim, Germany) in 20 ml medium inoculated with 6×10^5 wild-type SiD1 cells, or DtM1 that were obtained from mid-log exponential growing cultures. This is a number large enough to ensure a sufficiently large final population. All cultures kept under the selecting conditions for 20 days and then observed.

This period of time was long enough to allow control cultures to reach a high cell concentration. Under these conditions, cell concentrations were counted again and a comparison between control and experimental cultures was made. If a cell concentration in one of the treated tubes was similar to the control tubes, then the population had achieved noticeable growth. Subsequently, this population was ratcheted to the next cycle and subjected to a higher petroleum concentration (Fig. 2). Cultures not reaching a cell concentration similar to the one found in control cultures were not transferred. Each ratchet cycle entailed a threefold concentration increase. The next cycles of the treatment were selected as 2%, 3%, 4%, 6%, 9%, 12%, 16%, 21%, and 30% (v/v) of petroleum or diesel oil diluted in BG-11 medium as previously described.

Each individual culture presents a separate random chance of particular beneficial mutations, which may then arise individually. Consequently, each individual culture was treated as an independent population. Therefore, if a petroleum or diesel treated culture reached the growth observed in control cultures, it was ratcheted to the next cycle. Both petroleum or diesel treated cultures and controls were again inoculated at this next stage with identical cell concentrations to those used during the first ratchet cycle (6×10^5 cells). The last ratchet cycle was concluded when no further cell growth was observed in a specific replicate after a period of 90 days.

The classic equations of Novick and Szilard (1950) were used to estimate the number of generations during the ratchet experiments as follow:

$$N_t = N_0 2^{t/T}$$

$$g = \frac{t}{T}$$

where N_t is the number of cells at time t , N_0 is the number of cells at time 0, t is the time, T is the generation time and g is the number of generations.

2.5. Final toxicity test

Finally, the toxic effect of 9%, 12%, 16%, 21%, and 30% (v/v) of petroleum or diesel oil on photosynthetic performance and growth rate of derived cultures obtained after the ratchet experiment was assessed as previously described for wild-type strains before the

ratchet experiment. The maximal concentration that led to the growth of a derived culture obtained at the end of the ratchet cycles provides the estimate of maximum adaptation capacity of the aforementioned culture.

3. Results

3.1. Initial toxicity test

Fluka Analytical Petroleum Special Standard as well as Diesel Oil Standard were found to be extremely toxic to the three species sampled (Table 1). Concentrations of petroleum and diesel oil as low as 0.45% (v/v) produced a considerable inhibition of photosynthesis (PSII) in all the species tested. Damaging effects increased drastically at concentrations of 1.50% (v/v). Petroleum seems to be more toxic than diesel oil at high concentrations.

The toxic effects of petroleum and diesel oil demonstrated a wide degree of inter-specific variation. A concentration of 3% (v/v) of each selective agent was able to inhibit 100% of ϕ PSII and growth in the MaD3 strain (Cyanobacteria). In contrast, concentrations of 9% and 12% (v/v) of petroleum or diesel oil were required to inhibit 100% of growth in DtM1 strain and SiD1 strain, respectively (Table 1).

3.2. Fluctuation analysis

Three distinct results were obtained in the fluctuation analysis of MaD3, DtM1 and SiD1 strains under increased petroleum or diesel oil levels (Table 2):

- (i) Microalgae respond by means of physiological acclimatization at the lowest concentrations of petroleum or diesel oil (3% in the case of DtM1; 3% and 9% in the case of SiD1). Resistant cells were able to grow in all cultures of Set 1 and Set 2 experiments and no fluctuation was observed (variance/mean ≈ 1 was consistent with Poisson variability ($p < 0.05$, using χ^2 test of goodness of fit 2)).
- (ii) Microalgae adapt by means of rare spontaneous mutations at medium concentrations of petroleum or diesel oil (3% in the case of MaD3, 9% in the case of DtM1, 21% in the case of SiD1). In these instances, the cell density was drastically reduced in each experimental culture due to the destruction of sensitive cells. However, after further incubation for several weeks, several cultures regained density, due to the growth of petroleum or diesel oil resistant variants. In the case of Set 1, only some cultures recovered after 60 days of exposure (Table 2). In all Set 1 cultures, the variance significantly exceeded the mean (variance/mean > 1 ; $p < 0.001$, using χ^2 as a test of goodness of fit). In contrast, every Set 2 control culture recovered and a similar number of petroleum-resistant cells were detected in each culture (Table 2). The high fluctuation found in Set 1 cultures could reasonably be due to processes other than sampling error, which allow inferring that petroleum-resistant cells arose due to rare, pre-selective, spontaneous mutations. The estimated mutation rate μ from sensitivity to resistance to petroleum or diesel oil was between 1.2×10^{-5} and 1.8×10^{-5} mutants per cell division (Table 2).
- (iii) Microalgae are unable to growth (no adaptation) under the highest concentrations of petroleum or diesel oil (9% and 21% in the case of MaD3, 21% in the case of DtM1).

3.3. Ratchet selection

The potential for petroleum or diesel oil adaptation of the three strains were estimated in derived populations obtained by

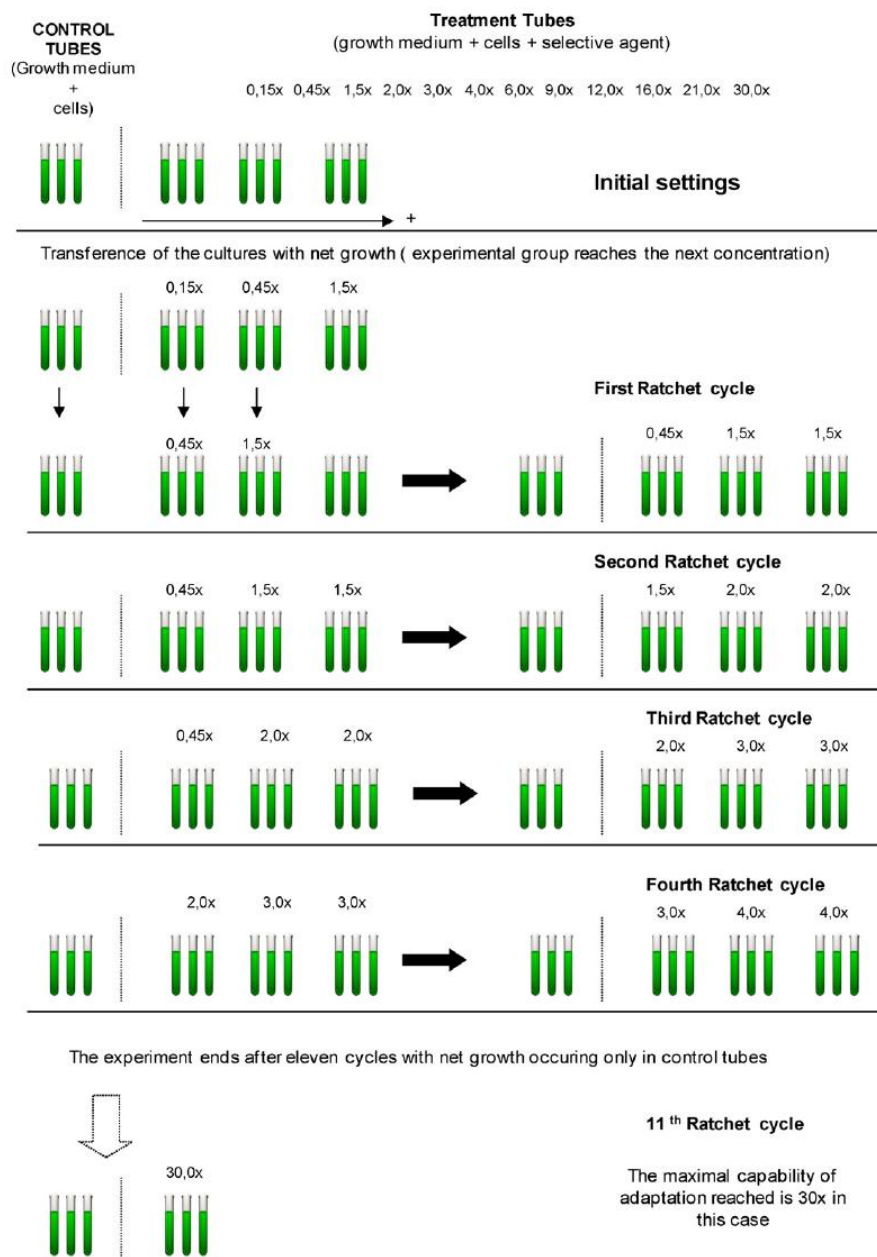


Fig. 2. Schematic representation of the Ratchet experimental design. Three replicates of the control cultures and three replicates of cultures for each of the three initial doses of selected agent are present in each ratchet cycle. Each tube is transferred to the next concentration when the same net growth as control tubes is reached (these tubes are represented as framed in the figure). Tubes that do not present net growth are maintained at the same concentration. A new ratchet cycle is considered each time control tubes are transferred. The experiment ends after six cycles with net growth occurring only in control tubes. Then, the maximal capability of adaptation corresponds to the maximal concentration of selective agent that present net growth.

continually maintaining large populations under strong selection pressure during the ratchet experiment (Table 3).

Considerable differences in the time or in the number of generations required to achieve growth under increasing concentrations of petroleum or diesel oil standard were also observed among the species tested (Table 3). The continental cyanobacteria MaD3

showed the minimum adaptation capacity as compared with the rest of the species. As indicated in Table 3, MaD3 was able to resist between 6 and 9% (v/v) petroleum or diesel oil but growth was not observed above this concentration. Therefore, 9% (v/v) was taken as the maximum concentration of petroleum or diesel oil at which these cyanobacteria could adapt. By contrast, the continental

Table 1
Initial toxicity test: effect of increasing doses of petroleum and diesel-oil on photosynthetic performance (Φ PSII) and growth rates (r) of *Scenedesmus intermedius* (SiD1), *Dunaliella tertiolecta* (DtM1) and *Microcystis aeruginosa* (MaD3) strains prior to the ratchet experiments. Dose in v/v (petroleum or diesel oil/culture medium).

Dose	% Inhibition of Φ PSII (mean \pm sd)					Growth rate (r) (mean \pm sd)				
	Petroleum standard			Diesel oil		Petroleum standard			Diesel oil	
	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	DtM1	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	MaD3
0% control	0	0	0	0	0	0.74 \pm 0.05	0.61 \pm 0.03	0.53 \pm 0.05	0.74 \pm 0.05	0.61 \pm 0.03
0.15%	3 \pm 0	1 \pm 0	8 \pm 2	4 \pm 0	3 \pm 1	0.73 \pm 0.2	0.61 \pm 0.04	0.43 \pm 0.05	0.72 \pm 0.04	0.60 \pm 0.03
0.45%	13 \pm 1	19 \pm 1	28 \pm 5	13 \pm 1	20 \pm 1	0.68 \pm 0.03	0.53 \pm 0.002	0.16 \pm 0.04	0.69 \pm 0.01	0.56 \pm 0.04
1.50%	25 \pm 2	28 \pm 1	79 \pm 4	19 \pm 1	27 \pm 1	0.36 \pm 0.06	0.29 \pm 0.08	0.09 \pm 0.05	0.45 \pm 0.05	0.31 \pm 0.10
3%	28 \pm 1	32 \pm 2	100	23 \pm 2	31 \pm 3	0.31 \pm 0.11	0.26 \pm 0.10	No growth	0.37 \pm 0.03	0.28 \pm 0.07
9%	50 \pm 1	84 \pm 9	100	31 \pm 2	85 \pm 11	0.04 \pm 0.03	No growth	No growth	0.11 \pm 0.04	No growth
12%	81 \pm 1	100	100	100	85 \pm 3	No growth	No growth	No growth	No growth	No growth

Chlorophyta species *S. intermedius* exhibited the maximum capability for adaptation to the pollutants. Growth was detected in cultures of SiD1 exposed to a concentration up to 11% (v/v) petroleum or diesel oil (Table 3). The coastal microalgae *D. tertiolecta* was still able to grow at 16% (v/v) of petroleum or diesel oil.

The ratchet selection progressed during numerous generations (around 310, 220 and 160 in SiD1, DtM1 and MaD3, respectively). The dynamics of the ratchet experiments also gave significant information. Each replicate evolves as an independent population. Consequently, three independent populations of each species were also analyzed. As a general rule, the three replicates of the same strain evolve similarly. Although differences in the time or in the number of generations required achieving growth under increasing concentrations of petroleum or diesel oil standard were also observed during the process to obtain adaptation in the ratchet experiment (Table 3). This inter-strain variation revealed the effect of randomness on adaptation.

3.4. Final toxicity test

Finally, inhibition of Φ (PSII) and growth rate by petroleum standard and diesel oil were compared among the ancestral populations (before the experiments), and the resistant mutants obtained by fluctuation analysis or by ratchet selection. (Tables 1 and 4, respectively). Resistant mutants obtained by fluctuation analysis show a significant increase in petroleum and diesel oil resistance. For example, 12% petroleum or diesel oil inhibited growth of wild type SiD1. In contrast, resistant mutants obtained by fluctuation analysis were able to grow at 21% petroleum or diesel oil concentrations. A concentration of 3% of petroleum or diesel oil inhibited growth of MaD3, but 9% petroleum or diesel oil was necessary to inhibit growth of resistant mutants obtained by fluctuation analysis.

Furthermore, all the resistant-derived cultures (MaD3, DtM1 and SiD1) obtained after the ratchet selection cycles show a significant increase in petroleum and diesel oil resistance compared to those which obtained resistance from fluctuation analysis. The maximal concentration that led to the growth of a derived culture obtained at the end of the ratchet selection cycles provides an estimation of maximum adaptation capacity of the aforementioned culture.

4. Discussion

There is abundant evidence that petroleum is toxic for microalgae, although some species are more resistant to oil contamination than others (Siron et al., 1996; Tewari et al., 2001; Suderman and Thistle, 2004; Varela et al., 2006; Salas et al., 2006). Accordingly, petroleum and diesel oil exposure inhibited 100% growth in all the species tested here prior to the ratchet selection process. In contrast, adaptation of phytoplankton to petroleum has been insufficiently studied to date. Understanding the mechanisms implicated in the adaptation of microalgae to petroleum contamination would surely be useful to make sound predictions about the evolutionary ecology of phytoplankton under petroleum contamination conditions.

Crude oil spills drastically reduce phytoplankton species richness, since the survival of microalgae under extreme petroleum contamination could only be achieved by some kind of adaptation (Lopez-Rodas et al., 2009; Carrera-Martinez et al., 2010, 2011). It is usually assumed that phytoplanktonic organisms can survive pollutants as a result of physiological acclimatization supported by modifications of gene expression. Nevertheless, when the concentration of a toxic factor exceeds physiological limits, survival is based on adaptive evolution, which ultimately depends on originating new mutations (Sniegowski and Lenski, 1995; Sniegowski, 2005).

Table 2

Fluctuation analysis to study adaptation of *M. aeruginosa* (Ma3D), *D. tertiolecta* (DtM1) and *Scenedesmus intermedius* (SiD1) isolated from pristine areas without crude oil contamination to increased doses of petroleum and diesel oil.

	Petroleum concentration (% v/v)					
	3%		9%		21%	
	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2
<i>M. aeruginosa</i> (Ma3D)						
No. of replicate cultures	50	25	50	25	50	25
No. of cultures containing						
0 resistant cells	9		50	25	50	25
From 1 to 10 ⁴	34	25				
>10 ⁴ resistant cells	7					
Fluctuation	Yes					
Adaptation mechanism	Mutation		None		None	
Mutation rate (μ)	1.7×10^{-5}					
<i>D. tertiolecta</i> (DtM1)						
No. of replicate cultures	50	25	50	25	50	25
No. of cultures containing						
0 resistant cells			15		50	25
From 1 to 10 ⁴			38	25		
>10 ⁴ resistant cells	50	25	7			
Fluctuation	No		Yes			
Adaptation mechanism	Physiological acclimation		Mutation		None	
Mutation rate (μ)			1.2×10^{-5}			
<i>Scenedesmus intermedius</i> (SiD1)						
No. of replicate cultures	50	25	50	25	50	25
No. of cultures containing						
0 resistant cells					13	
From 1 to 10 ⁴					32	25
>10 ⁴ resistant cells	50	25	50	25	5	
Fluctuation	No	No			Yes	
Adaptation mechanism	Physiological acclimation	Physiological acclimation			Mutation	
Mutation rate (μ)					1.3×10^{-5}	
	Diesel-oil concentration (% v/v)					
	3%		9%		21%	
	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2
<i>M. aeruginosa</i> (Ma3D) Set 1						
No. of replicate cultures	50	25	49	25	50	25
No. of cultures containing						
0 resistant cells	8		49	25	49	25
From 1 to 10 ⁴	31	25				
>10 ⁴ resistant cells	11					
Fluctuation	Yes		None		None	
Adaptation mechanism	Mutation					
Mutation rate (μ)	1.8×10^{-5}					
<i>D. tertiolecta</i> (DtM1)						
No. of replicate cultures	50	25	50	25	50	24
No. of cultures containing						
0 resistant cells			13		50	24
From 1 to 10 ⁴			38	25		
>10 ⁴ resistant cells	50	25	9			
Fluctuation	No		Yes			
Adaptation mechanism	Physiological acclimation		Mutation		None	
Mutation rate (μ)			1.3×10^{-5}			
<i>Scenedesmus intermedius</i> (SiD1)						
No. of replicate cultures	50	25	50	25	50	25
No. of cultures containing						
0 resistant cells					11	
From 1 to 10 ⁴					25	25
>10 ⁴ resistant cells	50	25	50	25	14	
Fluctuation	No		No		Yes	
Adaptation mechanism	Physiological acclimation		Physiological acclimation		Mutation	
Mutation rate (μ)					1.5×10^{-5}	

In the present experiments, when the different strains were exposed to petroleum or diesel oil, the cultures showed massive destruction of the sensitive cells. However, after further incubation under petroleum or diesel oil, some cultures were able to grow again due to cells that were resistant to the toxins. These resistant cells are the key to understanding adaptation of phytoplankton to petroleum or diesel oil contamination. Fluctuation analysis allows for the discrimination between resistant cells arising from rare

spontaneous mutations occurring randomly during replication of organisms prior to petroleum exposure and resistant cells arising through specifically acquired adaptation induced by petroleum exposure, or acclimatization resulting from modifications of gene expression.

The large fluctuation in the number of petroleum or diesel oil-resistant cells observed in Set 1 experiments, compared with the insignificant fluctuation in Set 2 controls (observed at

Table 3

Time (t) required to grow under increasing doses of petroleum or diesel oil during the ratchet experiment cycles. Dose in V/V (petroleum or diesel oil/culture medium).

Ratchet cycle	Population	Ratcheting dose	<i>Scenedesmus intermedius</i>		<i>Dunaliella tertiolecta</i>		<i>Microcystis aeruginosa</i>	
			Petroleum standard	Diesel oil standard	Petroleum standard	Diesel oil standard	Petroleum standard	Diesel oil standard
1st	1	0.15 → 0.45	20	20	20	20	40	20
	2	0.45 → 1.5	40	40	40	40	40	80
	3	1.5 → 2.0	40	40	40	40	80	80
2nd	1	0.45 → 1.5	40	20	40	40	40	40
	2	1.5 → 2.0	20	20	20	20	80	60
	3	2.0 → 3.0	20	20	20	40	80	80
3rd	1	1.5 → 2.0	20	20	20	20	20	20
	2	2.0 → 3.0	20	20	40	20	80	60
	3	3.0 → 4.0	20	20	40	40	80	80
4th	1	2.0 → 3.0	20	20	40	20	80	80
	2	3.0 → 4.0	20	20	40	40	60	60
	3	4.0 → 6.0	40	20	60	40	80	80
5th	1	3.0 → 4.0	20	20	40	40	60	60
	2	4.0 → 6.0	40	20	60	40	80	60
	3	6.0 → 9.0	60	40	80	60	80	80
6th	1	4.0 → 6.0	40	20	60	40	60	60
	2	6.0 → 9.0	60	40	60	60	80	80
	3	9.0 → 12.0	60	40	80	60	Unable	Unable
7th	1	6.0 → 9.0	40	40	60	40	Unable	Unable
	2	9.0 → 12.0	60	40	80	60	Unable	Unable
	3	12.0 → 16.0	60	40	80	80	–	–
8th	1	9.0 → 12.0	60	60	80	60	–	–
	2	12.0 → 16.0	60	60	80	80	–	–
	3	16.0 → 21.0	80	60	Unable	Unable	–	–
9th	1	12.0 → 16.0	80	60	80	80	–	–
	2	16.0 → 21.0	80	60	Unable	Unable	–	–
	3	21.0 → 30.0	80	80	–	–	–	–
10th	1	16.0 → 21.0	80	80	Unable	Unable	–	–
	2	21.0 → 30.0	Unable	Unable	–	–	–	–
11th	1	21.0 → 30.0	Unable	Unable	–	–	–	–

concentrations of 3%, 9% and 21% (v/v) petroleum or diesel oil water in Ma3D, DtM1 and SiD1, respectively) compared with the insignificant fluctuation in Set 2 controls, strongly suggests that these resistant cells arose by rare spontaneous single mutations and not through direct and specific adaptation in response to petroleum or diesel oil. The petroleum or diesel oil did not stimulate the appearance of resistant cells and the rapid lethal effect of oil hydrocarbons seems unlikely to allow for the appearance of adaptive mutations. In contrast, when the cultures are exposed to low concentrations of petroleum or diesel oil, no fluctuation was observed demonstrating that toxicity does not exceed physiological limits.

Since adaptation to extreme conditions, such as petroleum or diesel oil spills, is difficult, the classic point of view assumes that genetic adaptation under such extreme conditions is a gradual process (reviewed by Gould, 2002). In contrast, it is hereby proposed that cyanobacteria and microalgae can adapt to petroleum or diesel oil extremely rapidly by single mutations. Recent evidence suggests that mutation at one locus can enable adaptation of cyanobacteria and microalgae to other hostile environments (Flores-Moya et al., 2005; Costas et al., 2007; Lopez-Rodas et al., 2008a,b) as well as to sudden anthropogenic chemical contamination (Costas et al., 2001; Lopez-Rodas et al., 2001, 2006; Garcia-Villada et al., 2002, 2004).

The mutation rates from petroleum or diesel oil sensitivity to resistance ranged from 1.2×10^{-5} to 1.8×10^{-5} mutants per cell division. These values are among the highest found in microalgae. A similar fact was also observed in crude oil (Carrera-Martinez et al., 2010, 2011). Usually, mutation rates of microalgae from sensitivity to resistance to pollutants ranged from 10^{-5} to 10^{-7} , suggesting

that the genetic change necessary to become petroleum or diesel oil-resistant is more easily achieved by microalgae than adaptation to other types of contaminants.

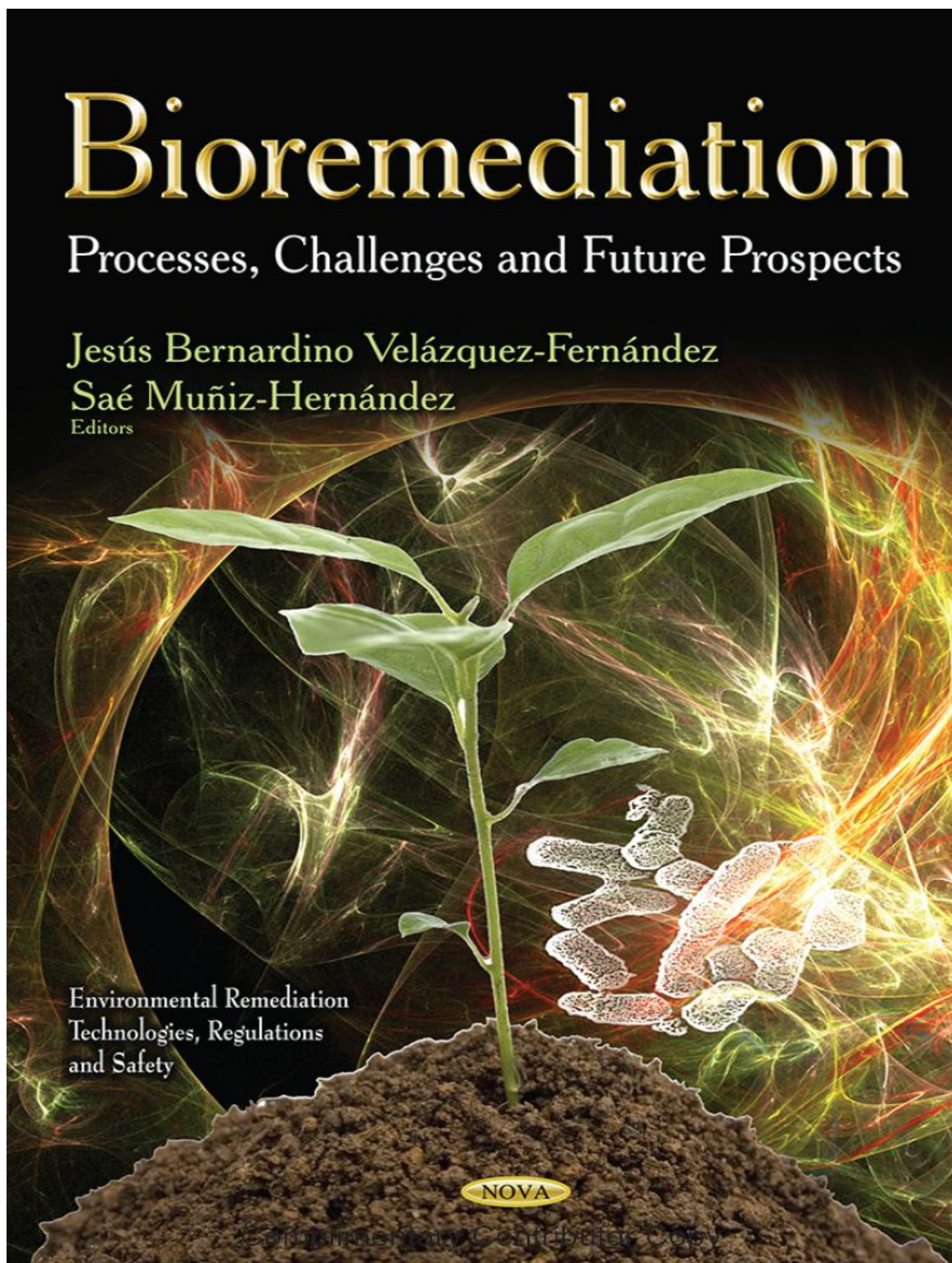
Apparently, adaptation to high concentrations of petroleum or diesel oil is complicated. Neither *M. aeruginosa* or *D. tertiolecta* were able to adapt rapidly to 9% or 21% (v/v) petroleum or diesel oil/medium, respectively, in fluctuation experiments. However, it is feasible to estimate the maximal capability for adaptation of microalgae to a selecting agent through experimental models by maintaining large populations of dividing cells under high selection pressure. This constraint can be overcome by performing experiments that include several values of selection pressure (Huertas et al., 2010, 2011). This approach ensures both the occurrence of mutations that confer adaptation and the simultaneous maintenance of a strong selection pressure, which ensure the preservation of such mutations within the population. These methodological approximations are referred to as ratchet assays.

Ratchet selection significantly increased petroleum or crude oil resistance (i.e. up to six times in *M. aeruginosa*). Ratchet estimates maximal capability of microorganisms to adapt to contamination as a result of two processes: (i) phenotypic acclimation supported by modifications of gene expression, and (ii) genetic adaptation supported by the occurrence of mutations that confer resistance and subsequent selection. However, the maximal resistance should be achieved by means of genetic adaptation. Carrera-Martinez et al. (2010, 2011) demonstrated that microalgae are able to proliferate under low concentrations of crude oil as a result of physiological acclimatization, but the adaptation of these microalgae to high

Table 4

Final toxicity test: effect of increasing doses of petroleum and diesel-oil on photosynthetic performance (ϕ PSII) and growth rates (r) of *S. intermedius* (SiD1), *D. tertiolecta* (DtM1) and *M. aeruginosa* (MaD3) resistant mutants obtained by fluctuation analysis and resistant strains obtained by ratchet selection. Dose in v/v (petroleum or diesel oil/culture medium).

Resistant mutants obtained by fluctuation analysis												
Dose (v/v)	% Inhibition of ϕ PSII (mean + sd)						Growth rate (r) (mean + sd)					
	Petroleum standard			Diesel oil			Petroleum standard			Diesel oil		
	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	DtM1	MaD3
0% control	0	0	0	0	0	0	0.74 ± 0.05	0.61 ± 0.03	0.53 ± 0.05	0.74 ± 0.05	0.61 ± 0.03	0.53 ± 0.05
0.15%	1	2 ± 1	6 ± 3	1	2 ± 1	6 ± 3	0.74 ± 0.06	0.60 ± 0.04	0.52 ± 0.05	0.75 ± 0.03	0.57 ± 0.06	0.51 ± 0.05
0.45%	5 ± 2	5 ± 3	14 ± 4	4 ± 3	5 ± 4	17 ± 2	0.71 ± 0.06	0.55 ± 0.03	0.29 ± 0.08	0.70 ± 0.03	0.55 ± 0.05	0.32 ± 0.03
1.50%	7 ± 1	9 ± 6	29 ± 11	7 ± 2	8 ± 3	28 ± 7	0.57 ± 0.11	0.51 ± 0.07	0.20 ± 0.07	0.56 ± 0.07	0.53 ± 0.10	0.17 ± 0.07
3%	10 ± 3	17 ± 7	50 ± 10	9 ± 4	14 ± 5	46 ± 10	0.46 ± 0.09	0.34 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.49 ± 0.12	0.36 ± 0.09	0.05 ± 0.04°
9%	15 ± 4	23 ± 10	98 ± 9	13 ± 6	21 ± 7	98 ± 10	0.34 ± 0.11	0.17 ± 0.08	No growth	0.36 ± 0.07	0.21 ± 0.08	No growth
12%	23 ± 4	31 ± 11	-	21 ± 7	32 ± 6	-	0.24 ± 0.13	0.09 ± 0.06	-	0.26 ± 0.02	0.11 ± 0.07	-
16%	35 ± 6	42 ± 9	-	33 ± 10	44 ± 5	-	0.09 ± 0.07	0.07 ± 0.05	-	0.11 ± 0.05	0.06 ± 0.04	-
21%	73 ± 7	97 ± 8	-	69 ± 9	91 ± 11	-	0.03 ± 0.02	No growth	-	0.05 ± 0.03	No growth	-
30%	91 ± 11	-	-	90 ± 10	-	-	No growth	-	-	No growth	-	-
Resistant strains obtained by ratchet selection												
Dose (v/v)	% Inhibition of ϕ PSII (mean + sd)						Growth rate (r) (mean + sd)					
	Petroleum standard			Diesel oil			Petroleum standard			Diesel oil		
	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	DtM1	MaD3	SiD1	DtM1	MaD3
0% control	0	0	0	0	0	0	0.74 ± 0.05	0.61 ± 0.03	0.53 ± 0.05	0.74 ± 0.05	0.61 ± 0.03	0.53 ± 0.05
0.15%	0	0	1	0	0	0	0.74 ± 0.06	0.60 ± 0.03	0.50 ± 0.02	0.72 ± 0.01	0.61 ± 0.04	0.51 ± 0.03
0.45%	1	2 ± 1	3 ± 1	0	1	2	0.72 ± 0.02	0.53 ± 0.01	0.38 ± 0.06	0.72 ± 0.02	0.55 ± 0.04	0.41 ± 0.04
1.50%	3 ± 1	5 ± 2	8 ± 3	3 ± 1	3 ± 1	7 ± 2	0.71 ± 0.04	0.47 ± 0.06	0.26 ± 0.08	0.73 ± 0.04	0.49 ± 0.05	0.30 ± 0.01
3%	4 ± 1	14 ± 4	21 ± 6	4 ± 1	10 ± 1	19 ± 2	0.70 ± 0.06	0.38 ± 0.05	0.24 ± 0.07	0.71 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.23 ± 0.05
9%	5 ± 4	21 ± 5	35 ± 3	5 ± 3	18 ± 4	32 ± 7	0.68 ± 0.05	0.28 ± 0.05	0.15 ± 0.09	0.69 ± 0.06	0.33 ± 0.07	0.16 ± 0.06
12%	10 ± 3	28 ± 6	100%	9 ± 2	29 ± 4	100%	0.61 ± 0.02	0.23 ± 0.08	No growth	0.65 ± 0.07	0.26 ± 0.03	No growth
16%	20 ± 2	49 ± 7	-	19 ± 3	48 ± 9	-	0.48 ± 0.03	0.12 ± 0.03	-	0.51 ± 0.04	0.14 ± 0.05	-
21%	25 ± 5	97 ± 11	-	23 ± 2	96 ± 7	-	0.42 ± 0.06	No growth	-	0.45 ± 0.04	No growth	-
30%	33 ± 7	-	-	31 ± 4	-	-	0.38 ± 0.06	-	-	0.39 ± 0.03	-	-
50%	39 ± 9	-	-	37 ± 6	-	-	0.34 ± 0.05	-	-	0.35 ± 0.03	-	-



In: Bioremediation: Processes, Challenges and Future Prospects ISBN: 978-1-62948-513-3
Editors: Jesús Bernardino Velázquez-Fernández et al. © 2014 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 10

SELECTED MICROALGAE FOR PETROLEUM BIOREMEDIATION: TOWARDS A BIO-DEPURATION BASED ON VON NEUMANN-LIKE MACHINES

Julia Romero-Lopez, Victoria Lopez-Rodas and Eduardo Costas*
Genetics, Veterinary Faculty, Complutense University, Madrid, Spain

ABSTRACT

Production, transport and use of petroleum hydrocarbons are sources of pollution worldwide. Consequently, numerous chemical, physical and biological methods have been used to remedy this problem. Here we show an efficient bio-remediation procedure based on the principles of the von Neumann self-replicating machine that is capable of manufacturing a copy of itself while doing its work. Long-term contaminations by petroleum spills occur in the Arroyo Minero River, Argentina. After a crude oil spill made in 1915, crude oil was poured continuously into the Arroyo Minero River. Surprisingly, an abundant microalgae biomass (mainly *Scenedesmus* sp) is living in contact with crude oil. We isolated these microalgae to be used for petroleum bioremediation. Afterwards, we genetically selected the microalgae by increasing the selection pressures to petroleum-resistance. As intended, two efficient petroleum-removing strains were obtained (So3p and Sr4p). To analyze capability for petroleum degradation, 1×10^6 microalgae mL^{-1} were cultured in the presence of 5% petroleum over 15 days (final cell density around 13.4×10^6 cells). Afterwards, the petroleum amount was measured in the experiments as well as in controls without microalgae according to 418b EPA and ASTM 3921 procedures. Both microalgal strains were able to efficiently biodegrade petroleum (So3p degraded 50% of petroleum whereas Sr4p degraded 63%). These cells are a promising procedure for petroleum bioremediation based on von Newman's self-replicating machine concept.

Keywords: Microalgae, *Scenedesmus*, petroleum, hydrocarbons, biodegradation, bioremediation

* Corresponding Author address: Email: ecostas@ucm.es.

INTRODUCTION

Petroleum hydrocarbon is the main source of energy in the world. Unfortunately, production, transport, use and disposal of petroleum globally have made it a major contaminant in both prevalence and quantity in the environment (Rahman, 2002). Many attempts to remedy this problem have been tried using chemical, physical and biological methods (Kelkar et al., 2007; Chaillan et al., 2006). Among the biological methods, bacterial bioremediation has been widely used (reviewed by Yang et al., 2009).

Nowadays, large quantities of crude oil are extracted, refined and handled each year, and despite improvements in security, transport and containment, it is possible that these activities may cause accidental spills in aquatic ecosystems. Often, crude oil travels great distances, and some discharges inevitably occur from owned transport vehicles, tanks or pipelines.

In addition to occasional oil spills, due to the routine washing of storage tanks, or errors in handling, some accidental major spills occur. For example: i) the crude oil spill from tanker Prestige in 2002 where around 50,000 tons of crude oil were spilled out onto the Spanish Galician coast (Carrera-Martinez et al., 2010); ii) the spill from an off-shore British Petroleum (BP) oil rig in the Gulf of Mexico. The movements of the stains remain difficult to predict for the latest one as the source of the spill is 1600 meters below sea level, and the winds and currents affect the diffusion of crude oil. (Mariano et al., 2011; Dietrich et al., 2012; Venosa & Zhu, 2003).

The consequences of crude oil spills in water are usually catastrophic. In aquatic ecosystems, its main components, hydrocarbons, can stay for more than 5 years causing toxicity (Lindstrom & Braddock 2002; Kobayashi et al., 2009; Pelletier et al., 2004). The magnitude of the catastrophe will depend on the extent, the amount of oil, how it is degraded chemically and physically and the conditions of their displacement, due to currents and tides.

The methods used to reduced spill impacts numerous attempts to reduce the impacts caused by spills can be classified into three large groups:

- i) Physical methods: so far the first used in all disasters that occurred, consisting of the removal of crude oil through its mechanical collection with cranes, with networks or even manually.
- ii) Chemical methods: consisting of the action of a chemical agent that degrades the components of crude oil in other components easily removable, less toxic, or that allow waste removal from the landfill through physical methods.
- iii) Bioremediation methods: degradation of chemicals is done by living organisms, especially microorganisms to obtain energy, cellular metabolite, and biological waste products (Rahman et al., 2002).

The majority of the organisms used in bioremediation have been single species of bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* (Obayori, 2009; Medina-Bellver et al., 2005; Zhang et al., 2005), *Rhodococcus opacus* (Winkelmann et al., 2009), consortia of bacteria (Komukai-Nakamura et al., 1996; Rahman et al., 2002) or genetically-engineered bacteria. In this regard, these genetically modified bacteria have proved to be more efficient than their corresponding wild bacteria. So far, most attempts to elimination of crude oil are assumed to generate hazardous waste (Incardona et al., 2009; Wang et al., 2009).

What if a material capable of degrading petroleum and contributing to a new food chain could be found?

We propose a new approach for the bioremediation of crude oil spills by using primary producers, i.e., initiators of trophic chains, so they do not need to be removed from the aquatic ecosystem once used. In addition, the use of photosynthetic organisms for crude oil degradation reduces the greenhouse effect. The organisms chosen for this purpose were microalgae able to live in environments contaminated with hydrocarbons, specifically *Scenedesmus obtusus* and *Scenedesmus* sp, which are able to efficiently biodegrade petroleum hydrocarbons.

METHODS

We studied an interesting example of extreme contamination by crude oil in the Arroyo Minero river, Río Negro state, Argentina, where an oil exploration has been pouring crude oil since 1915 (Lopez-Rodas et al., 2009). Two microalgal species living in direct contact with the crude oil spill were isolated and grown under laboratory conditions. They were the unicellular chlorophyta *Scenedesmus obtusus* (strain So3P) and *Scenedesmus* sp cf. *S. rapaporti* sp. nov. (strain Sr4P).

The strains obtained from *Scenedesmus obtusus* and *Scenedesmus* sp were cultivated at a temperature of 22°C under continuous light of 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ using day-light fluorescent tubes (Phillips TLD 36W/33, France), 400-700 nm wavelength (photosynthetically active light). The cells grew in Pyrex flasks of 250 mL culture (Barloworld Scientific Ltd, Stone, U.K.) with BG-11 medium for inland waters microalgae (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany), filtered through a membrane sterile 0.22 μm (Express Plus Membrane, Millipore Iberica S.A.). Cultures were maintained axenically under exponential growth by serial transfers of aliquots to new BG-11 medium once a month. The absence of bacteria in the cultures was confirmed by a fluorescence microscope after acridine orange staining.

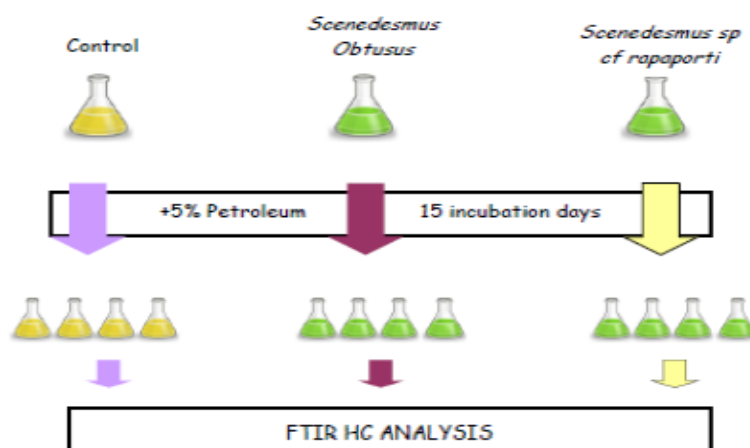


Figure 1. Experimental design for Petroleum biodegradation.

Both strains (So3P and Sr4P) were maintained under laboratory conditions that allow a balance between strong selection intensity, by means of a 1% addition of petroleum to the culture medium and the maintenance of a population size large enough to increase probability of rare spontaneous mutations that confer petroleum adaptation (Romero-Lopez et al., 2012).

The aim of this study was to determine the capability of both strains to degrade hydrocarbons from petroleum. For this purpose, four experiments were established with a 5% Fluka Analytical Petroleum special standard with the following experimental design (Figure 1).

Four controls containing 5% Fluka Analytical Petroleum special standard with BG-11, as well as 2 series (one for each microalgae strain) of four replicates each, containing 50 mL of microalgae biomass (10^6 cells/mL), 45 mL of BG-11 (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany) and 5 mL of Fluka Analytical Petroleum Special were prepared. Preparations were sonicated (4 pulses every 20 seconds, with a power of 40 watts and at a frequency of 16 kHz) with vibrating Cell (Sonics & Materials Inc., Danbury CT, USA) prior to microalgal addition to assure fuel homogenization. After the microalgae addition, controls and samples were incubated in a culture chamber for 15 days at 22°C and $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of continuous light. Afterwards, the samples were filtered using a 0.22 μm filter to remove algal biomass and any other solid matter.

Obtained aqueous extracts were analyzed according to EPA 418b (Petroleum Hydrocarbons (Spectrophotometric, Infrared) and ASTM 3921 (Standard Test Method for Oil and Grease and Petroleum Hydrocarbons in Water) methods, for measuring the hydrocarbon degradation rate.

RESULTS AND DISCUSSION

While anthropogenic crude oil spills usually have dramatic effects on wildlife, microalgae are able to proliferate in the mix of crude oil and fresh water (9.2°C, pH=8.1, 11.71% v/v hydrocarbons/water) that emerged from the underground in the Arroyo Minero (Lopez-Rodas et al., 2009, Carrera-Martinez et al., 2011).

After isolation of two crude oil-resistant microalgal strains from Arroyo Minero, they were maintained for four years under petroleum exposure in laboratory conditions for two reasons: i) to assure a strong selection for crude oil resistance (by the addition of petroleum to culture medium) and, ii) to increase the probability of petroleum-resistant mutants occurrence (by maintaining a very large population). The result was that both strains (So3P and Sr4P) proliferated successfully under high concentrations (5%) of petroleum.

As controls show, crude oil does not degrade spontaneously under experimental conditions. However, both microalgae strains were able to degrade hydrocarbons from petroleum with great efficiency (Figure 2). The strain So3P degraded 49% of the petroleum standard in 15 days, whilst the strain Sr4P degraded 74% of the petroleum standard in that same time (Figure 2).

Extreme environments, characterized by extreme values of pH, toxic materials, high or low temperatures and other factors, allow the adaptation of many micro-organisms to unusual conditions. The proliferation of these micro-organisms in extreme environments is motivated

by the natural selection of spontaneous mutants which occurs randomly and without influence of the selective agent.

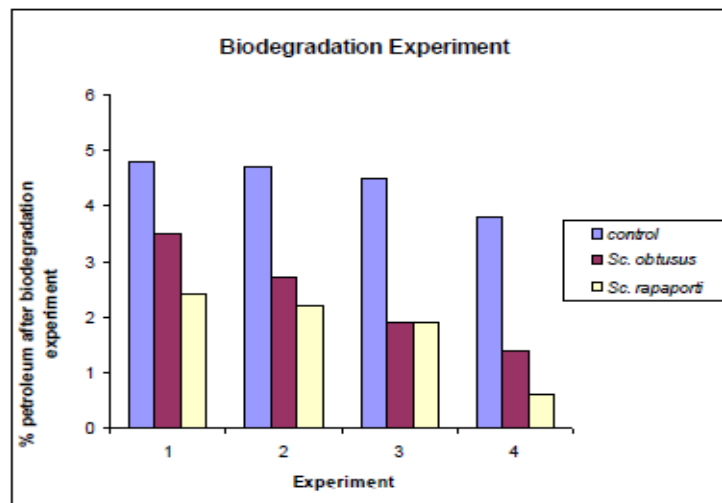


Figure 2. Data of biodegradation of crude oil by microalgae.

Consequently, most of the crude oil-degrading species have been found in the vicinity of petroleum discharges (Yang et al., 2009; Dasa et al., 1999; Mackew et al., 2007; Zinjarde & Pant, 2002). Usually, they are bacterial species but a significant microalgal biomass occurs in the most polluted areas of Arroyo Minero.

Our results indicate that the microalgae *Scenedesmus* strains So3P and Sr4P could be an interesting alternative for petroleum spill remediation.

In general, physical crude oil elimination methods applied to the crude oil and other fuel spills are complex to use, due to expansions of spills and remediation of such responsiveness (Trejo-Hernández et al., 2007; Hughey et al., 2007; Nikolopouou & Kalogerakis 2008; Chaîneau et al., 2005). In addition, these methods are only effective in the early stages after the spill, and they are generally problematic because the collected waste is toxic and its storage is difficult. Chemical methods, in the same way, have serious problems. Used dispersants can be an effective alternative, but they are very selective agents, in which the ability to act, i.e., the chemical reaction produced, require specific conditions of temperature and kinetics to provide adequate yields (Lindstrom et al., 2002; Li et al., 2007). Even in the best cases, hydrocarbons, and the crude oil itself, are not completely degraded or are transformed into toxic products with catastrophic results. Many experts argue that the combination of dispersants and their own aggregates can be more toxic for the ecosystem than the crude itself only. After the last spill in the Gulf of Mexico, the EPA did studies that showed that dispersants are not a good alternative to alleviate the effects of discharges (Li et al., 2007; Chaîneau et al., 2005; Kelkar et al., 2007; Saeki et al., 2009; Stockstad, 2010).

Biodegradation seems to be an effective procedure to remove the oil from oil spills in aquatic environments. In cases of greater discharges, as in the case of the ship Exxon Valdez spill in 1989, or the Prestige in 2002, around 50% of the crude oil present in the water was biodegraded during the first three years after the spill (Vega et al., 2009). Several works have

been performed in biodegradation of crude oil (Kelkar et al., 2007; Obuekwe et al., 2009; Reddy & Quinn, 1999). This biodegradation can be accelerated by the addition of nutrients to the environment to stimulate the growth of populations of degrader microorganisms (Chaîneau et al., 2005; Atlas, 1995). Bioremediation can be a useful technique for discharges of light crude oils, while heavy crude oil spills require physical methods of absorption before bioremediation (Mohajeri et al., 2010). The decision to employ physical or chemical methods with bioremediation in a discharge of crude oil in aquatic environments depends on the spill area, physical conditions, the protection habitat objectives and any other factor that could have an impact on the selected process.

The election of microorganisms used in bioremediation is complex. Most of the studies were carried out with bacterial organisms (Chaillan et al., 2006; Ijah et al., 2003; Rahman et al., 2002) but use of non-native bacteria in biodegradation could start problems in the ecosystems where these microorganisms are used (Anderson et al., 2009; Wang et al., 2009). Sometimes bacteria used in bioremediation treatment are hazardous for native species, making it necessary to remove them once the toxic agent is degraded (Saeki et al., 2009). Several authors have stated that the wastes of hydrocarbons degraded by bacteria are more toxic to aquatic organisms (fish, shrimps and mussels embryo) than expected (Pelletier et al., 2004; Dasa et al., 2007). In addition to this, the reserves of oxygen and nutrients available in the ecosystem are altered by the presence of large amounts of bacteria stimulated by the use of hydrocarbons as energy sources (Chaîneau et al., 2005).

In this regard, if we consider microalgae for crude oil degradation, we find important advantages over the use of bacteria. The bacterial degradation products from crude oil spills are less complex than those of microalgae and in some cases are even toxic (Pelletier et al., 2004). Microalgae can degrade hydrocarbons from crude oil very efficiently. A massive growth of the microalgae population has fewer problems than those of bacterial growth because microalgae constitute the most important group of primary producers in the food chain from aquatic ecosystems.

CONCLUSION

1. Both microalgal *Scenedesmus* strains (So3P and Sr4P) isolated from the crude oil spill from Arroyo Minero resist very high petroleum concentrations under laboratory conditions.
2. Both strains degrade crude oil very efficiently (Sr4P up to 74% and So3P until 49% of the total petroleum after 15 days).
3. Using microalgae for crude oil bioremediation has significant advantages in efficiency and impact on the environment.

REFERENCES

- Anderson, B.S., Arenella-Parkenson, D., Phillips, B., Tjeerdema, R., Crane, D., 2009 Preliminary investigation of the effects of dispersed Prudhoe Bay Crude Oil on

- developing topsmelt embryos, *Atherinops affinis*. *Environmental Pollution*, 157, 1058-1061.
- Atlas, R.M., 1995. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.*, 31, 178-182.
- Carrera-Martinez, D., Mateos, A., Lopez-Rodas, V. & Costas, E., 2010. Microalgae response to petroleum spill: An experimental model analysing physiological and genetic response of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to oil samples from the tanker Prestige. *Aquat. Toxicol.*, 97, 151-159.
- Carrera-Martinez, D., Mateos, A., Lopez-Rodas, V., Costas, E., 2011. Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination *Aquat. Toxicol.*, 101, 342-350.
- Chaillan, F., Gugger, M., Saliot, A., Coute, A. & Oudot, J., 2006. Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat. *Chemosphere*, 62, 1574-1582.
- Chaineau, C.H., Rougeux, G., Yepremian, C. & Oudot, J., 2005. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil. Biol. Biochem.*, 37, 1490-1497.
- Dasa, K. & Mukherjee, A. 1999. Crude petroleum-oil biodegradation by naturally Inhabiting Mixed Bacterial Culture under Different Environmental Factors. *Pak. J. Med. Sci.*, 4, 1211-1218.
- Dasa, K. & Mukherjee, A. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from Northeast India. *Bioresource Technol.*, 98, 1339-1345.
- Dietrich, J.C., Trahan, C.J., Howard, M.T., Fleming, J.G., Weaver, R.J., Tanaka, S., Yu, L., Luettich, R.A., Dawson, C.N., Westerink, J.J., Wells, G., Lu, A., Vega, K., Kubach, A., Dresback, K.M., Kolar, R.L., Kaiser, C., Twilley, R.R., 2012. Surface trajectories of oil transport along the Northern Coastline of the Gulf of Mexico. *Cont. Shelf. Res.*, 41, 17-47.
- Hughey, C., Galasso, S.A. & Zumbege, J.E., 2007. Detailed compositional comparison of acidic NSO compounds in biodegraded reservoir and surface crude oils by negative ion electrospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Fuel*, 86, 758-768.
- Ijah, U.U.J. & Antai, S.P. 2003. Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 51, 93-99.
- Incardona, J., Carls, M., Day, H.L., Sloan, C., Bolton, J., Collier, T. & Scholz, N. Cardiac 2009. Arrhythmia Is the Primary Response of Embryonic Pacific Herring (*Clupea pallasii*) Exposed to Crude Oil during Weathering. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 201-20.
- Kelkar, D.S., Kumar, A.R. & Zinjarde, S.S. 2007. Hydrocarbon emulsification and enhanced crude oil degradation by lauroyl glucose ester. *Bioresource Technol.*, 98, 1505-1508.
- Kobayashi, T., Murai, Y., Tatsumi, K. & Iimura, Y. 2009. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. enhanced by water-extractable organic matter from manure compost. *Sci. Total. Environ.*, 407, 5805-5810.
- Komukai-Nakamura, S., Sugiura, K., Yamauchi-Inomata, Y., Toki, H., Venkateswaran, K., Yamamoto, S., Tanaka, H. & Harayama, S. 1996. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian crude oil. *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 570-574.

- Li, Z., Kepkay, P., Lee, K., King, T., Boufadel, M.C. & Venosa, A. 2007. Effects of chemical dispersants and mineral fines on crude oil dispersion in a wave tank under breaking waves. *Mar. Pollut. Bull.*, 54, 983-993.
- Lindstrom, J.E. & Braddock, J.F.. 2002. Biodegradation of petroleum hydrocarbons at low temperature in the presence of the dispersant Corexit 9500. *Mar. Pollut. Bull.*, 4, 739-747.
- López-Rodas, V. Carrera-Martínez, D., Salgado, E., Mateos-Sanz, A., Báez, J.C. & E Costas, E. 2009. A fascinating example of microalgal adaptation to extreme crude oil contamination in a natural spill in Arroyo Minero, Río Negro, Argentina. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 75, 883-899.
- Mariano, A.J. , Kourafalou, V.H. , Srinivasan, A., Kang, H., Halliwell, G.R., Ryan, E.H., Roffer, M.. 2011. On the modeling of the 2010 Gulf of Mexico Oil Spill. *Dynam. Atmos. Oceans*, 52, 322– 340.
- Mckew, B., Coulon, F., Yakimov, M., Denaro, R., Genovese, M., Smith, M., Cindy, J., Osborn, A.M., Timmis, K. & McGenity, T. 2007. Evidence for in situ crude oil biodegradation after prestige oil spill. *Environ. Microbiol.*, 9, 1562-1571.
- Medina-Bellver, J., Marin, P., Delgado, A., Rodriguez-Sanchez, A., Reyes, E., Ramos, J.L. & Marques, S. 2005. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ. Microbiol.*, 7, 773-779.
- Mohajeri, L., Aziz, H., Isa, M. & Zahed, M. 2010. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. *Bioresource Technol.*, 101, 893-900.
- Nikolopoulou, M. & Kalogerakis, N. 2008. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Mar. Pollut. Bull.*, 56, 1855-1861.
- Obayori, O., Adebuseye, S., Adewale, A., Oyetibo, G., Oluyemi, O., AMokun, R. & Ilori, M. 2009. Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four *Pseudomonas* strains. *J. Environ. Sci.*, 21, 243-248.
- Obuekwe, C., Al-Jadi, Z. & Al-Saleh, E. 2009. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 63, 273-279.
- Pelletier, E., Delille, D. & Delille, B. 2004. Crude oil bioremediation in sub-Antarctic intertidal sediments: chemistry and toxicity of oiled residues. *Marine Environmental Research*, 57, 311-327.
- Rahman, K. Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P. & Banat, I.M. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology*, 85, 257-261.
- Reddy, C.M. & Quinn, J.G. 1999. GC-MS analysis of total petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater samples after the North Cape oil spill. *Mar. Pollut. Bull.*, 38, 126-135.
- Romero-Lopez, J., Lopez-Rodas, V., Costas, E.. 2012. Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination. *Aquat. Toxicol.*, 124-125, 227-237.

- Saeki, H., Sasaki, M., Komatsu, K., Miura, A. & Matsuda, H. 2009. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. *Bioresource Technol.*, 100, 572-577.
- Stokstad, E. 2010. Dispersant Study Released by EPA, But Big Questions Remain. *Science*, Jun 30.
- Trejo-Hernández, M.R., Ortiz, A., Okoh, A.I., Morales, D. & Quintero, D. 2007. Biodegradation of heavy crude oil Maya using spent compost and sugar cane bagasse wastes. *Chemosphere*, 68, 848-855.
- Vega, F., Covelo, E., Reigosa, M. & Andrade, M.L. 2009. Degradation of fuel oil in salt marsh soils affected by the Prestige oil spill. *J. Hazard. Mater.*, 166, 1020-1029.
- Venosa, A.D. & Zhu, X. 2003. Biodegradation of Crude Oil Contaminating Marine Shorelines and Freshwater Wetlands. *Spill Sci. Technol. B*, 8, 163-178.
- Wang, Y., Zhou, Q., Peng, S., Ma, Q. & Niu, X. . 2009. Toxic effects of crude-oil-contaminated soil in aquatic environment on *Carassius auratus* and their hepatic antioxidant defense system. *J. Environ. Sci.*, 21, 612-617.
- Winkelmann, M., Hunger, N., Hüttl, R. & Wolf, G. . 2009. Calorimetric investigations on the degradation of water insoluble hydrocarbons by the bacterium *Rhodococcus opacus* 1CP. *Thermochimica Acta*, 482, 12-16.
- Yang, S., Jin, H., Wei, Z., He, R., Ji, Y., Li, X. & Yu, S. . 2009. Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review. *Pedosphere*, 19, 371-381.
- Zhang, G., Wu, Y. Qian, X. & Meng, Q.. 2005. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *J. Zhejiang Univ-Sc. B Science*, 6, 725-730.
- Zinjarde, S.S. & Pant, A.A. 2002. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. *Mar. Pollut. Bull.*, 44, 118-121.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de investigación ha sido desarrollado dentro del grupo de investigación del departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y financiado en parte por proyectos de colaboración con Iberdrola.Ingeniería y Construcción.SAU.

No me extenderé demasiado en los agradecimientos, porque como bien me dijeron unos amigos una vez, "las tesis hay que abandonarlas en algún momento, porque si no, no se acabarían nunca. Siempre se nos ocurre algo nuevo que corregir o que cambiar", y en mi caso, este es el momento del "abandono". Pero no me gustaría abandonar sin agradecer a todas las personas que han hecho posible que este trabajo se finalice.

En primer lugar querría darles las gracias a mis directores, Eduardo Costas Costas y Victoria López Rodas porque sin ellos, no podría nunca haber terminado esta tarea.

Gracias a Eduardo, por convencerme de que soy capaz de hacer casi cualquier cosa que me proponga, incluso cuando yo misma no lo creía.

Por enseñarme a distinguir los mutantes superdotados, Victoria, gracias.

A mi familia, por la comprensión y el apoyo en todo momento, incluso en aquellos donde parecía que me quedaba sin fuerzas, GRACIAS.

Gracias a Dilin, por recordarme siempre que cosas son importantes y cuáles no, y por dejarme trabajar en mis discursos.

Gracias a Menchu, por los ánimos constantes.

Gracias, al grupo de investigación de la Facultad de Veterinaria, en especial a Lara, por cuidarme los bichos, y porque siempre ha sabido como conseguir que sonriera.

Gracias a Cristina, porque siempre ha estado ahí, cuando la he necesitado, por tantas conversaciones sobre ciencia hasta altas horas de la madrugada, por motivarme en todo momento, y por recordarme que la ciencia es divertida.

A Mayte, un enorme Gracias, por su comprensión, y su apoyo en todo momento, incluso cuando no se encontraba en la mejor disposición.

Gracias a todos los EVAOPs, y algunos EVATIs, por darme ánimos, siempre que lo he necesitado y por hacerme reír cuando no tenía ánimos.

Gracias a Vero, "pour être simplement".

Y por último, querría agradecerle también a la empresa Iberdrola. Ingeniería y Construcción.SAU, por financiar parte de estas investigaciones y hacer posible este trabajo.